

Expertos Invitados

¿PODRÍAN LAS VARIANTES GENÉTICAS DE LAS PROTEÍNAS SURFACTANTES DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*?

Columnista experta de SIIC
Dra. Joanna Floros, PhD



Profesora, Especialista en Fisiología Celular y Molecular y Pediatría. Departamentos de Fisiología Celular y Molecular, y de Pediatría, The Milton S. Hershey center, Pennsylvania State University College of Medicine, Hershey, EE.UU.

Otro trabajo publicado: Floros J, Wang G: «A point of view: quantitative and qualitative imbalance in disease pathogenesis; pulmonary protein surfactant protein A genetic variants as a model», *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 129(1):295-303, May 2001

Hershey, EE.UU. (**especial para SIIC**)

Los análisis de regresión identificaron variantes genéticas de proteínas surfactantes o alelos asociados con aumento o disminución del riesgo (susceptibilidad), lo que sugiere que las variantes genéticas son marcadores útiles para el estudio de la tuberculosis.

RESUMEN

El aumento mundial de la incidencia de tuberculosis es un motivo de considerable preocupación y muchos se preguntan cómo revertir, detener o minimizar esta tendencia. No todos los individuos en riesgo padecen tuberculosis activa y, en consecuencia, se plantearon importantes interrogantes acerca de la variabilidad individual en la susceptibilidad a la enfermedad, los mecanismos subyacentes, los tratamientos específicos y los puntos de intervención. Para obtener una perspectiva más clara de todos estos ítems, este trabajo estudia la hipótesis que plantea que las variantes genéticas de las proteínas surfactantes (SP) pueden servir como marcadores para identificar a subgrupos con diferente susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. El fundamento para estudiar estas moléculas es doble. En primer lugar, intervienen en la defensa innata del pulmón del huésped (primera línea de defensa) o en la función pulmonar normal. En segundo lugar, estas moléculas se identifican con la variabilidad genética natural que puede servir como «rótulo» para facilitar la identificación de subgrupos de individuos con susceptibilidades diferentes. Se realizaron estudios genotípicos para alelos del marcador de SP en tres grupos de individuos positivos para tuberculosis y dos controles (prueba cutánea de tuberculina positiva y sujetos sanos seleccionados al azar). Los análisis de regresión identificaron variantes genéticas de SP o alelos asociados con aumento o disminución del riesgo (susceptibilidad), lo que sugiere que las variantes genéticas son marcadores útiles para el estudio de la tuberculosis.

Palabras clave: estudio de asociación, genotipo, inmunidad innata, proteína surfactante.

Abreviaturas:

Bacilo de Calmette-Guerin: BCG
Proteína surfactante: SP
Proteína surfactante A: SP-A
Proteína surfactante B: SP-B
Proteína surfactante D: SP-D
Región no traducida 3': 3' UTR
Región no traducida 5': 5' UTR

ABSTRACT

The growing global incidence of tuberculosis has raised considerable concerns as well as questions as to how to reverse, halt, or minimize this trend. The fact that not all individuals at risk develop active tuberculosis raises important questions regarding variability among individuals in disease susceptibility, underlying mechanisms, specific therapies, and points of intervention. To gain insight into these issues, we studied the hypothesis that surfactant protein (SP) genetic variants can serve as markers to identify disease subgroups with different susceptibilities. The rationale for focusing on these molecules is twofold. First, these molecules are involved in the innate lung host defense (first line of defense) and/or the normal lung function. Thus, their functional capabilities are relevant to the issue at hand. Second, these molecules are identified with natural genetic variability that can serve as «tag» to facilitate identification of subgroups of individuals with different susceptibilities. Three groups of subjects, tuberculosis positive and two controls (tuberculin-skin test positive, and healthy randomly picked subjects) were genotyped for the SP marker alleles. Regression analyses identified SP genetic variants or alleles that associate with increased or decreased risk (susceptibility), suggesting that the SP genetic variants are useful markers in the study of tuberculosis.

Key words: association study, genotype, innate immunity, surfactant protein

Abbreviations:

bacillus Calmette – Guerin: BCG
surfactant protein A: SP-A
surfactant protein B: SP-B
surfactant protein D: SP-D
5' untranslated region: 5' UTR
3' untranslated region: 3' UTR
surfactant protein: SP

INMUNIDAD, PROTEINAS SURFACTANTES Y MICROAMBIENTE

Inmunidad

Durante los últimos 500 millones de años, desde la aparición de los peces agnatos (lampreas), los organismos vivos se protegen de los invasores extraños mediante dos sistemas de inmunidad, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.¹ La defensa innata del huésped o primera línea de defensa fue el primer sistema en aparecer, hace 600 o 700 millones de años, y se lo encuentra en organismos primitivos como esponjas y estrellas de mar. Es un sistema rápido, que se activa pocos minutos después de la aparición del invasor y se caracteriza por una forma de ataque inespecífica. Esta inespecificidad de las moléculas de defensa innatas se debe a que reconocen patrones presentes en moléculas de diversas clases de invasores, y su actividad no depende del reconocimiento de antígenos específicos

Por otra parte, la respuesta adaptativa es de aparición más tardía (500 millones de años), es específica (reconoce antígenos extraños específicos), más lenta y se activa horas o días después de la aparición del invasor. La mayoría de las moléculas de defensa innata pueden eliminar satisfactoriamente los millones de invasores extraños (bacterias, pólenes, otras partículas antigénicas o irritantes) que diariamente entran en contacto con el pulmón, sin necesidad de que intervenga la inmunidad adaptativa. No obstante, el compromiso de la capacidad funcional de las moléculas de defensa innata o una sobrecarga del sistema por aumento de la carga en el microambiente local activará la participación de la inmunidad adaptativa con el fin de resolver la infección.

A medida que se asciende por la escala evolutiva, parece aumentar la complejidad de las moléculas de defensa, según se evalúa con uno de los sistemas genéticos estudiados aquí: la proteína surfactante A humana. Tal vez esta mayor complejidad asegura una diversidad molecular más adecuada para defender al organismo de un número creciente de peligros ambientales a medida que se cubre un territorio más extenso (los animales superiores de la escala evolutiva) y se encuentran nuevos ambientes con diferentes tipos de pólenes, microorganismos y otros irritantes antigénicos. La molécula de defensa pulmonar innata del huésped SP-A (véase más adelante), que puede servir como ejemplo de esta complejidad evolutiva, aumentó la complejidad de su estructura mediante el aumento del número de genes (figura 1) y de su variabilidad genética (figuras 1 y 2). En la figura 3 se observa una representación esquemática de la variabilidad genética. Los roedores tienen un único gen de SP-A, pero posteriormente en la evolución, la aparición de los primates marcó el desarrollo de un episodio de duplicación en el locus genético de SP-A (figura 1), lo que produjo dos genes funcionales (SP-A1 y SP-A2). Los genes de SP-A humanos se identifican por su mayor complejidad, tanto en las regiones codificantes de proteínas como en las no codificantes; esto produce diferencias cualitativas^{2,4} y cuantitativas^{5,6} respectivamente. Suponemos que la complejidad de la SP-A ilustrada en la figura 2, al menos en parte, es una característica única de los seres humanos. Los experimentos de extensión de *primers* brindan datos con algún sustento para esta hipótesis.^{7,8} Sugerimos que las moléculas de defensa innata del huésped correspondientes a la proteína surfactante (véase más adelante), SP-A y SP-D, desempeñan algún papel en las etapas iniciales de la defensa contra la tuberculosis.

Proteínas surfactantes

Las proteínas surfactantes pulmonares SP-A, SP-B y SP-D cumplen importantes funciones en la defensa del huésped (SP-A, SP-D), la regulación de los procesos inflamatorios en el pulmón (SP-A) y la función y la estructura pulmonares (SP-B, SP-A).^{9,10} Se demostró que tanto la SP-A como la SP-D se unen al *Mycobacterium tuberculosis* y regulan su fagocitosis por los macrófagos alveolares.¹¹⁻¹³ En el ser humano existen dos genes de SP-A (SP-A1 y SP-A2) y cada uno de ellos se puede encontrar en diversas formas genéticas en la población general (figura 1).

Number of SP-A genes in mammals and genetic variants in humans

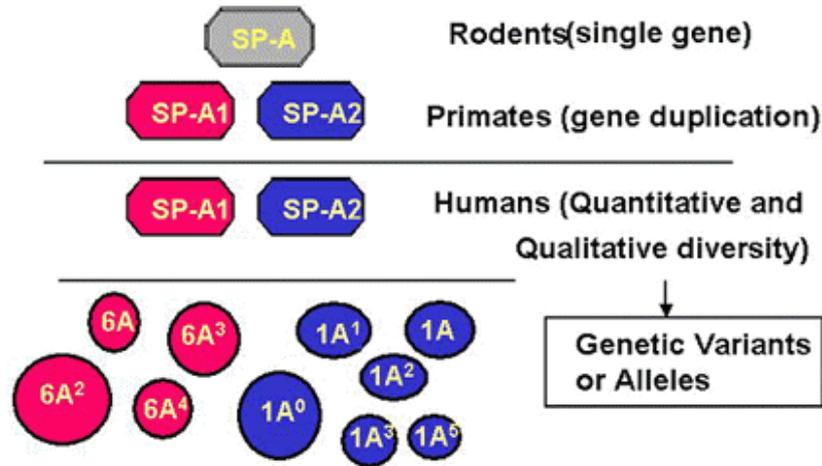


Figura 1. Número de genes de SP-A en mamíferos y variantes genéticas en seres humanos. Los roedores tienen un único gen de SP-A. Los primates y los seres humanos tienen dos genes de SPA (SP-A1 y SP-A2). Además, en estos últimos se observa considerable diversidad. Se presentan las variantes genéticas o alelos⁴³ observados con mayor frecuencia en seres humanos, con las secuencias codificantes. Estos alelos se clasifican según las diferencias en las secuencias de codificación. El tamaño del círculo de cada alelo intenta ilustrar esquemáticamente la frecuencia de estos alelos en la población general. Por ejemplo, los alelos 6A² y 1A⁰ son los hallados con mayor frecuencia en los genes de SP-A1 y SP-A2, respectivamente, en tanto que los alelos 6A y 1A⁵ son menos frecuentes en la población.

En este trabajo, me referiré a estas formas como variantes genéticas o alelos. La SP- A1 (6A, 6A², 6A³, 6A⁴) y la SP-A2 (alelos 1A, 1A⁰, 1A¹, 1A², 1A³, 1A⁵) difieren entre sí en las regiones codificantes y no codificantes de proteínas. Las primeras contienen información para la molécula funcional -es decir, la proteína- y, por lo tanto, las diferencias entre los alelos en esta región pueden provocar diferencias cualitativas (figura 2).

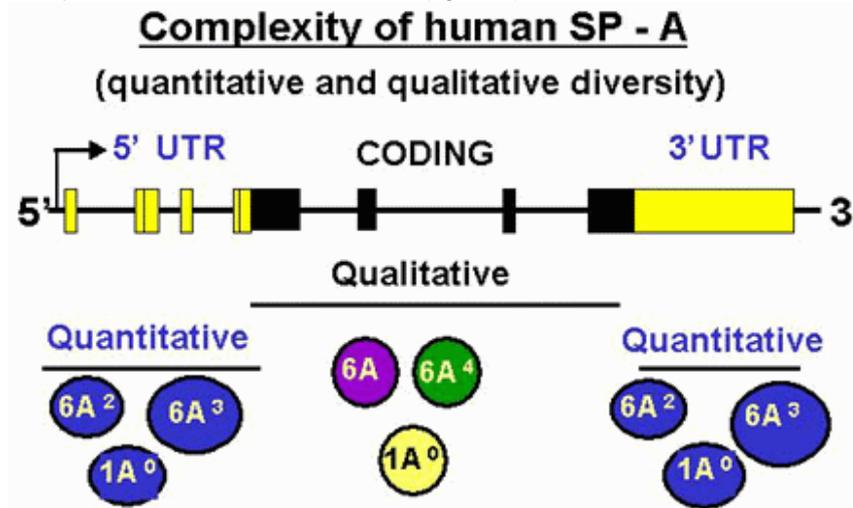


Figura 2. Representación esquemática parcial de la complejidad de SP-A en las secuencias codificantes y no codificantes. En la región codificante, se observaron diferencias en los nucleótidos que podrían modificar el aminoácido codificado, lo que da origen a variantes con diferencias funcionales o estructurales potenciales. En la región no codificante se observaron diferencias en la región no traducida 3' (3' UTR). Estas podrían ser importantes en la regulación de la expresión basal de SP-A y en la respuesta a agentes como los glucocorticoides. En la región no traducida 5' (5' UTR) se observaron diferencias en los nucleótidos y variaciones en las uniones. Una de estas regiones reguladoras (3' UTR, 5' UTR) o ambas pueden estar afectadas en la regulación de la SP-A. Esta variabilidad genética podría reflejar diferencias cualitativas o cuantitativas. Las diferencias podrían contribuir a la variabilidad individual de la susceptibilidad y podrían explicar las diferencias individuales observadas en este sentido. El tamaño del círculo de los alelos bajo 5' UTR o 3' UTR ilustra diferencias potenciales en la cantidad, en tanto que los diferentes colores en la región codificante ilustran diferencias funcionales/estructurales.

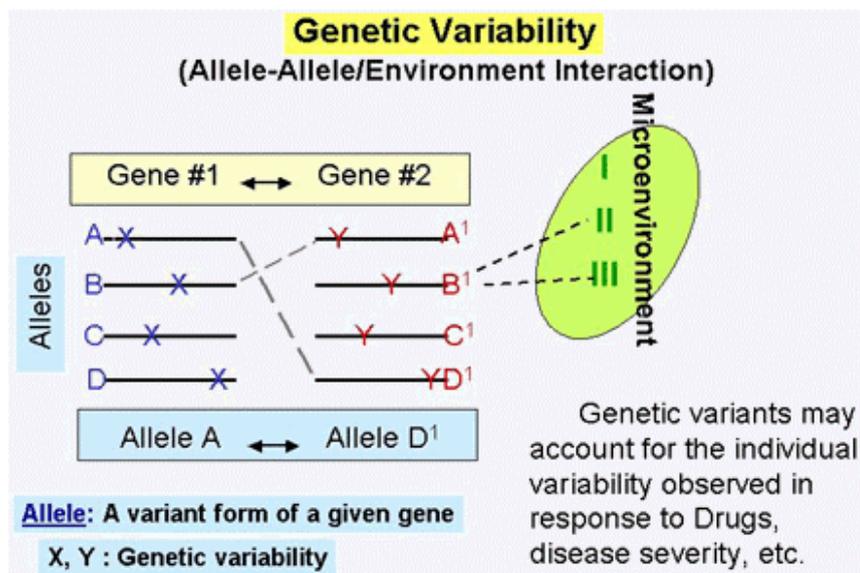


Figura 3. Representación esquemática genérica de la variabilidad genética. Se presentan dos genes hipotéticos, gen # 1 y gen # 2, con cuatro alelos cada uno -A, B, C, D y A¹, B¹, C¹ y D¹, respectivamente. Cada alelo o variante genética difiere (X o Y) de los otros alelos del gen correspondiente. También, el producto de un conjunto de alelos que interactúan (por ejemplo, A_D¹) puede diferir del de otros genes que interactúan (por ejemplo, B_A¹). Además, las diferencias pueden aumentar en ciertas condiciones (por ejemplo, en distintos microambientes) y pueden determinar o contribuir a nuestro estado de salud o enfermedad. En otras palabras, nuestra variabilidad genética puede constituir la base para explicar la variabilidad individual observada entre los individuos en la respuesta a los fármacos, la gravedad de la enfermedad y otras características.

Las regiones no codificantes (5' UTR, 3' UTR, figura 2) pueden participar en la regulación de la expresión del gen particular y, por lo tanto, las diferencias entre los alelos en esta región podrían provocar diferencias cuantitativas, es decir, en la cantidad de una proteína en particular, tanto en su nivel basal o en respuesta a diversos fármacos. Las diferencias entre alelos pueden ser pequeñas en condiciones normales y, por lo tanto, sin importancia fisiológica. No obstante, en ciertas circunstancias, como por ejemplo, en presencia de *M. tuberculosis*, las diferencias podrían magnificarse y desempeñar un papel importante en la determinación del estado de salud o enfermedad de un individuo en particular.¹⁴ Por cierto, existen evidencias que indican que existen diferencias cuantitativas^{5,6} y cualitativas^{2,3} entre las variantes de SP-A. También se demostró que algunas variantes se asocian con mayor o menor frecuencia de síndrome de distrés respiratorio en el recién nacido prematuro,¹⁵⁻¹⁸ con otitis media recurrente,¹⁹ infección por virus sincicial respiratorio²⁰ y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.²¹ También se han identificado variantes genéticas de SP-D y SP-B, pero por el momento se ignora si se asocian con diferencias cuantitativas o cualitativas. Aunque la ausencia de expresión de SP-B en ratones²² o seres humanos²³ es incompatible con la vida, la disminución de sus concentraciones, como sucede en el caso de ratones heterocigotas SP-B (-/+)²⁴

provoca anomalías fisiológicas pequeñas pero significativas, como disminución de la distensibilidad y aumento del atrapamiento aéreo. En el ratón heterocigota (+/-), sólo se expresa un alelo SP-B y las concentraciones de la proteína son aproximadamente la mitad de las observadas en el ratón SP-B (+/+) homocigota, en el que se expresan ambos alelos. Pensamos que diferentes concentraciones de SP-B podrían influir sobre la función pulmonar, con alteración del microambiente local; a su vez, este cambio podría promover la susceptibilidad a la infección tuberculosa. En este estudio concentramos nuestra atención en los sistemas de defensa del huésped, las variantes genéticas de SP-A, SP-D y SP-B, así como los marcadores relacionados con esta última, conocidos como microsatélites.²⁵ Los microsatélites son regiones del genoma humano que exhiben gran variabilidad genética. En consecuencia, los microsatélites tendrían mayor sensibilidad (es decir, serían mejores «rótulos») para identificar subgrupos con diferente susceptibilidad al desarrollo de enfermedad. En este estudio se utilizaron los adyacentes a SP-B.

Con el fin de investigar el papel de la SP-A, SP-D, SP-B y marcadores microsatélites ligados a SP-B, estudiamos asociaciones de alelos marcadores con el fin de identificar las variantes genéticas o alelos de SP que se relacionan con mayor o menor riesgo de tuberculosis.²⁶ Se realizó un estudio con estas características por dos razones. Nuestra primera hipótesis planteaba que los marcadores genéticos de SP (y tal vez otros no estudiados aquí) podrían distinguir a los individuos con riesgo de presentar tuberculosis activa de aquellos que no desarrollan esta forma de la enfermedad. Por otra parte, si se conocieran mejor los mecanismos que conducen al desarrollo de tuberculosis en subgrupos de pacientes identificados por sus SP u otros marcadores, sería posible administrar fármacos u otras intervenciones terapéuticas específicos para cada subgrupo. En consecuencia, este tratamiento orientado más específicamente podría mejorar la evolución clínica de cada paciente.

Microambiente

Nuestra hipótesis parte de la presunción de que la enfermedad pulmonar refleja un desequilibrio de las complejas y diversas interacciones entre los factores genéticos y ambientales.¹⁴ Por ejemplo, un cambio en el microambiente, como el producido ante la presencia de un patógeno, podría tener una influencia considerable sobre la estructura o la función de las moléculas en el microambiente local. La magnitud de los cambios moleculares estructurales o funcionales podría depender de la genética del individuo (es decir, de la variante genética específica) y esto, a su vez, podría explicar por qué algunos individuos son más susceptibles que otros a una determinada enfermedad, en condiciones ambientales similares.

En el caso de las proteínas surfactantes, se demostró que la SP-A estimula la producción de TNF-alfa y de óxido nítrico por los macrófagos después de la incubación con bacilos de Calmette-Guerin.²⁷ Aún se debe determinar si las diferencias en la capacidad de las variantes de SP-A para estimular la producción de citoquinas proinflamatorias por las células THP-1, una línea celular semejante a los macrófagos,^{2,3} aumenta al máximo en presencia de un patógeno. Sin embargo, si así fuera, es posible que las moléculas surfactantes de defensa pulmonar sean uno de los factores que contribuyen a la patogenia de la tuberculosis.

VARIANTES GENÉTICAS DE LAS PROTEÍNAS SURFACTANTES Y TUBERCULOSIS

En un estudio piloto con individuos de nacionalidad mexicana determinamos los genotipos de SP-A, SP-B, SP-D y marcadores microsatélites adyacentes a SP-B en tres grupos de individuos:

- pacientes con tuberculosis activa (n = 107)
- individuos en riesgo (n = 71) convivientes con pacientes con tuberculosis y con prueba tuberculínica positiva
- individuos sanos, no fumadores (n = 101).

Con posterioridad, estudiamos la frecuencia de las variantes genéticas de proteínas surfactantes (o alelos) en los grupos estudiados mediante análisis univariados y multivariados. También determinamos si la presencia de una variante genética en particular del gen X podría

alterar la susceptibilidad a la tuberculosis en individuos con una variante genética del gen Y.

El fundamento de este conjunto de experimentos era la posibilidad de que la evolución de un conjunto de alelos que interactúan y contribuyen a la enfermedad difiera de la de otro conjunto de alelos de los mismos genes.

Los resultados demostraron que la frecuencia de diversas variantes genéticas difería significativamente al comparar el grupo con tuberculosis con los sujetos sanos de control o con el grupo con reacciones cutáneas positivas. Sobre la base del odds ratio, la frecuencia de dos alelos SP-A (1A³, 6A⁴), un SP-B (B1013_A) y un SP-D (DA11_C), así como la de ciertos alelos microsatélites aumentó o disminuyó en el grupo con tuberculosis, lo que sugirió que algunos eran factores de riesgo o de protección para la tuberculosis. Además, la presencia de dos alelos de susceptibilidad, 1A³ y B1013_A o 6A² y 1A³ en el mismo individuo aumentaba aún más la susceptibilidad a la tuberculosis.

Los datos de este estudio piloto indicaron que las variantes genéticas de las proteínas surfactantes (más probablemente junto con muchos otros alelos marcadores) pueden ser útiles para identificar a los individuos con riesgo de desarrollar tuberculosis activa.

Debido al tamaño relativamente pequeño de la muestra en estudio, cabe advertir que algunos de los alelos significativos identificados podrían deberse simplemente al azar, aunque esta probabilidad es bastante baja.²⁶ Por el momento se desconocen los mecanismos subyacentes que determinan cómo aumentan o disminuyen el riesgo de tuberculosis las variantes significativas presentes en un individuo. No obstante, la información disponible sugiere que las diferencias en los nucleótidos de las variantes de proteínas surfactantes que pueden modificar o no el aminoácido codificado, pueden afectar la estructura, función o regulación de estas proteínas.^{2-5,7} Estas diferencias, a su vez, pueden afectar uno o varios procesos que intervienen en la patogenia de la tuberculosis. Por ejemplo, la SP-A unida al *M. tuberculosis* promueve su captación y fagocitosis por los macrófagos alveolares,^{12,13} y estimula la destrucción de las micobacterias.²⁷ Los mecanismos mediante los cuales se producen estos eventos mediados por la SP-A podrían incluir la unión de la proteína a los lipoglucanos micobacterianos,^{28,29} unión de la SP-A a un receptor específico del macrófago,³⁰ o destrucción de las micobacterias mediante una vía dependiente del óxido nítrico.²⁷ Por lo tanto, las variantes de SP-A (debido a sus diferencias genéticas) pueden exhibir distinta capacidad para regular uno o más de los eventos mencionados mediante sus diferencias funcionales/estructurales o cuantitativas. Tales diferencias podrían aumentar o disminuir el riesgo de tuberculosis activa en ciertas circunstancias.

Por cierto, se observaron niveles elevados de SP-A en individuos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)³¹ y se sugirió que el aumento de la SP-A favorece la destrucción de las micobacterias a través de la vía dependiente del óxido nítrico.²⁷ Es posible que la aparente discrepancia se deba a mecanismos diferentes, aún desconocidos, que actúan en distintos cuadros clínicos *in vivo* (por ejemplo, en presencia de SIDA o sin él). Por lo tanto, la SP-A podría ser ventajosa o perjudicial para el patógeno, según los mecanismos que intervengan o las influencias del microambiente local en su función.

Por otra parte, la SP-D promueve la autoagregación de micobacterias³³ e inhibe la captación de *M. tuberculosis* por los macrófagos humanos.¹¹ Aunque la agregación de micobacterias no es necesaria para reducir la captación por los macrófagos, es posible que las micobacterias aglutinadas aumenten su depuración mediante mecanismos mucociliares. De acuerdo con la información disponible, la SP-D parece proteger de la infección por micobacterias al inhibir las etapas iniciales de la infección. Son interesantes los hallazgos recientes sobre el papel de las células dendríticas en la formación de granulomas pulmonares inducida por el bacilo Calmette-Guerin (BCG).³⁴ Las células dendríticas de estos granulomas exhiben una potente función de presentación de antígenos. Aunque recientemente se demostró que la SP-D estimula la presentación de antígenos por las células dendríticas,³⁵ se ignora si potencia esta acción en los granulomas inducidos por BCG. Debido a que las actividades de la SP-D pueden variar entre las distintas variantes genéticas, las diferencias entre éstas podrían brindar distintos grados de protección contra la infección por *M. tuberculosis* en dos puntos importantes. Ya sea por su influencia sobre las etapas iniciales de la infección mediante la inhibición de la captación de micobacterias por los macrófagos o en el comienzo de la respuesta inmunológica adaptativa mediante el aumento de la presentación de antígenos, promoviendo así la resolución de la infección.

HIPÓTESIS Y CONSIDERACIONES FINALES

Las moléculas de defensa innatas del huésped, SP-A y SP-D, tienen acciones complementarias y que se superponen. Con respecto a la infección por *M. tuberculosis*, estas moléculas pueden actuar por diferentes mecanismos^{11,27} para eliminar al patógeno, aunque en ciertas circunstancias la SP-A³¹ puede promover la supervivencia de este patógeno intracelular.³² Estas observaciones sugieren la participación de diferentes mecanismos (al menos en el caso de la SP-A) en distintas circunstancias clínicas. Además, estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que la SP-A afecta la función de los macrófagos y de otras células del sistema inmunitario.^{27,30,36-41} Por lo tanto, la SP-A podría contribuir a la susceptibilidad de la infección por micobacterias mediante su efecto sobre la función de los macrófagos. Este efecto sería secundario a diferencias en la actividad de las distintas variantes de la SP-A, las que podrían incluir:

- a. diferencias en su capacidad para unirse al *M. tuberculosis* o a los macrófagos
- b. diferencias en su capacidad para asegurar la eliminación o supervivencia del *M. tuberculosis* (las variantes de SP-D también podrían modificar la susceptibilidad del huésped mediante diferencias en su interacción con *M. tuberculosis*)
- c. diferencias en su capacidad para «iniciar» o regular la función de los macrófagos alveolares para combatir a los invasores perjudiciales.⁴²

Esto último se explica por la capacidad de las variantes de SP-A para producir citoquinas proinflamatorias de modo diferencial^{2,3} o mediante las diferencias potenciales en su capacidad para regular la expresión de moléculas de adhesión³⁶ u otras moléculas. Sugerimos que las diferencias en los alelos (como en presencia de un patógeno o de afectación de la función pulmonar) podrían incluso aumentar en condiciones de compromiso, con alteración funcional y fracaso de este sistema defensivo innato para resolver de inmediato la agresión. El fracaso de la capacidad de las moléculas de defensa innata para eliminar patógenos en el primer encuentro puede ser crítico en la progresión ulterior y el establecimiento de la enfermedad. En resumen, las variantes genéticas de proteínas surfactantes pueden ser útiles para identificar a subgrupos de pacientes con mayor o menor riesgo de tuberculosis y, mediante sus diferencias genéticas, podrían contribuir en forma diferencial a la patogenia de esta enfermedad. Se requieren más estudios para determinar el mecanismo subyacente en distintos subgrupos de enfermedad con el fin de identificar puntos de intervención terapéutica específica para cada subgrupo, que permitan obtener una mejor evolución clínica en cada paciente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Sra. Sue Myers por el tipeo del manuscrito. Subvención R37 HL34788 de *National Institutes of Health*

BIBLIOGRAFIA

1. Lappé, M. A system out of balance. The Tao of immunology: A revolutionary new understanding of our body's defenses., pp. 27-44. New York and London: Plenum Trade, 1997.
2. Wang, G., Phelps, D. S., Umstead, T. M., and Floros, J. Human SP-A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF-alpha production in the THP-1 cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278: L946-54., 2000.
3. Wang, G., Umstead, T. M., Phelps, D. S., Al-Mondhry, H., and Floros, J. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein A variants to stimulate cytokine production. *Environ Health Perspect*, 110: 79-84, 2002.
4. Garcia-Verdugo, I., Wang, G., Floros, J., and Casals, C. Structural analysis and lipid binding properties of recombinant human surfactant protein A (SP-A) derived from one (SP-A1 or SP-A2) or both genes. *Biochemistry*, in press, 2002.
5. Hoover, R. R., and Floros, J. SP-A 3'-UTR is involved in the glucocorticoid inhibition of human SP-A gene expression. *Am J Physiol*, 276: L917-24, 1999.

6. Karinch, A. M., deMello, D. E., and Floros, J. Effect of genotype on the levels of surfactant protein A mRNA and on the SP-A2 splice variants in adult humans. *Biochem J*, 321: 39-47, 1997.
7. Karinch, A. M., and Floros, J. 5' splicing and allelic variants of the human pulmonary surfactant protein A genes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 12: 77-88., 1995.
8. Gao, E., Wang, Y., McCormick, S. M., Li, J., Seidner, S. R., and Mendelson, C. R. Characterization of two baboon surfactant protein A genes. *Am J Physiol*, 271: L617-30, 1996.
9. Floros, J., and Phelps, D. Pulmonary Surfactant. In: T. L. Yaksch, C. Lynch III, W. M. Zapol, M. Maze, J. F. Biebuyck, and L. J. Saidman (eds.), *Anesthesia: Biological Foundations*, pp. 1259-1280. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
10. Phelps, D. S. Surfactant regulation of host defense function in the lung: a question of balance. *Pediatr Pathol Mol Med*, 20: 269-92, 2001.
11. Ferguson, J. S., Voelker, D. R., Ufnar, J. A., Dawson, A. J., and Schlesinger, L. S. Surfactant protein D inhibition of human macrophage uptake of *Mycobacterium Tuberculosis* is independent of bacterial agglutination. *J Immunol*, 168: 1309-14, 2002
12. Pasula, R., Downing, J. F., Wright, J. R., Kachel, D. L., Davis, T. E., Jr., and Martin, W. J., 2nd. Surfactant protein A (SP-A) mediates attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17: 209-17, 1997.
13. Gaynor, C. D., McCormack, F. X., Voelker, D. R., McGowan, S. E., and Schlesinger, L. S. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol*, 155: 5343-51, 1995.
14. Floros, J., and Wang, G. A point of view: quantitative and qualitative imbalance in disease pathogenesis; pulmonary surfactant protein A genetic variants as a model. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 129: 295-303, 2001.
15. Floros, J., and Kala, P. Surfactant proteins: molecular genetics of neonatal pulmonary diseases. *Annu Rev Physiol*, 60: 365-84, 1998.
16. Floros, J., and Hoover, R. R. Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D. *Biochim Biophys Acta*, 1408: 312-22, 1998.
17. Floros, J., Fan, R., Matthews, A., DiAngelo, S., Luo, J., Nielsen, H., Dunn, M., Gewolb, I. H., Koppe, J., van Sonderen, L., Farri-Kostopoulos, L., Tzaki, M., Ramet, M., and Merrill, J. Family-based transmission disequilibrium test (TDT) and case-control association studies reveal surfactant protein A (SP-A) susceptibility alleles for respiratory distress syndrome (RDS) and possible race differences. *Clin Genet*, 60: 178-87, 2001.
18. Floros, J., Fan, R., DiAngelo, S., Guo, X., Wert, J., and Luo, J. Surfactant protein (SP) B associations and interactions with SP-A in white and black subjects with respiratory distress syndrome. *Pediatr Int*, 43: 567-76, 2001.
19. Rämét, M., Lofgren, J., Alho, O. P., and Hallman, M. Surfactant protein-A gene locus associated with recurrent otitis media. *J Pediatr*, 138: 266-8, 2001.
20. Lofgren, J., Ramet, M., Renko, M., Marttila, R., and Hallman, M. Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants. *J Infect Dis*, 185: 283-9, 2002.
21. Guo, X., Lin, H. M., Lin, Z., Montano, M., Sansores, R., Wang, G., DiAngelo, S., Pardo, A., Selman, M., and Floros, J. Surfactant protein gene A, B, and D marker alleles in chronic obstructive pulmonary disease of a Mexican population. *Eur Respir J*, 18: 482-90, 2001.
22. Clark, J. C., Wert, S. E., Bachurski, C. J., Stahlman, M. T., Stripp, B. R., Weaver, T. E., and Whitsett, J. A. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 7794-8., 1995.
23. Lin, Z., deMello, D. E., Wallot, M., and Floros, J. An SP-B gene mutation responsible for SP-B deficiency in fatal congenital alveolar proteinosis: evidence for a mutation hotspot in exon 4. *Mol Genet Metab*, 64: 25-35., 1998.
24. Clark, J. C., Weaver, T. E., Iwamoto, H. S., Ikegami, M., Jobe, A. H., Hull, W. M., and Whitsett, J. A. Decreased lung compliance and air trapping in heterozygous SP-B-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16: 46-52., 1997.
25. Kala, P., Koptides, M., Diangelo, S., Hoover, R. R., Lin, Z., Veletzka, V., Kouretas, D.,

- and Floros, J. Characterization of markers flanking the human SP-B locus. *Dis Markers*, 13: 153-67., 1997.
26. Floros, J., Lin, H. M., Garcia, A., Salazar, M. A., Guo, X., DiAngelo, S., Montano, M., Luo, J., Pardo, A., and Selman, M. Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population. *J Infect Dis*, 182: 1473-8., 2000.
 27. Weikert, L. F., Lopez, J. P., Abdolrasulnia, R., Chroneos, Z. C., and Shepherd, V. L. Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279: L216-23, 2000.
 28. Sidobre, S., Nigou, J., Puzo, G., and Riviere, M. Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacteria. Critical role of the lipids for lectin-carbohydrate recognition. *J Biol Chem*, 275: 2415- 22, 2000.
 29. Sidobre, S., Puzo, G., and Riviere, M. Lipid-restricted recognition of mycobacterial lipoglycans by human pulmonary surfactant protein A: a surface- plasmon-resonance study. *Biochem J*, 365: 89-97, 2002.
 30. Weikert, L. F., Edwards, K., Chroneos, Z. C., Hager, C., Hoffman, L., and Shepherd, V. L. SP-A enhances uptake of bacillus Calmette-Guerin by macrophages through a specific SP-A receptor. *Am J Physiol*, 272: L989-95, 1997.
 31. Phelps, D. S., and Rose, R. M. Increased recovery of surfactant protein A in AIDS -related pneumonia. *Am Rev Respir Dis*, 143: 1072-5, 1991.
 32. Martin, W. J., 2nd, Downing, J. F., Williams, M. D., Pasula, R., Twigg, H. L., 3rd, and Wright, J. R. Role of surfactant protein A in the pathogenesis of tuberculosis in subjects with human immunodeficiency virus infection. *Proc Assoc Am Physicians*, 107: 340-5, 1995.
 33. Ferguson, J. S., Voelker, D. R., McCormack, F. X., and Schlesinger, L. S. Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol*, 163: 312-21, 1999.
 34. Tsuchiya, T., Chida, K., Suda, T., Schneeberger, E. E., and Nakamura, H. Dendritic cell involvement in pulmonary granuloma formation elicited by bacillus calmette-guerin in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 165: 1640-6, 2002.
 35. Brinker, K. G., Martin, E., Borron, P., Mostaghel, E., Doyle, C., Harding, C. V., and Wright, J. R. Surfactant protein D enhances bacterial antigen presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281: L1453-63, 2001.
 36. Kremlev, S. G., and Phelps, D. S. Effect of SP-A and surfactant lipids on expression of cell surface markers in the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol*, 272: L1070-7, 1997.
 37. Kremlev, S. G., Umstead, T. M., and Phelps, D. S. Surfactant protein A regulates cytokine production in the monocytic cell line THP-1. *Am J Physiol*, 272: L996-1004., 1997.
 38. Kramer, B. W., Jobe, A. H., Bachurski, C. J., and Ikegami, M. Surfactant protein A recruits neutrophils into the lungs of ventilated preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 158-65, 2001.
 39. LeVine, A. M., Hartshorn, K., Elliott, J., Whitsett, J., and Korfhagen, T. Absence of SP-A modulates innate and adaptive defense responses to pulmonary influenza infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282: L563-72, 2002.
 40. Awasthi, S., Coalson, J. J., Yoder, B. A., Crouch, E., and King, R. J. Deficiencies in lung surfactant proteins A and D are associated with lung infection in very premature neonatal baboons. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 389-97, 2001.
 41. Koptides, M., Umstead, T. M., Floros, J., and Phelps, D. S. Surfactant protein A activates NF-kappa B in the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol*, 273: L382-8., 1997.
 42. Floros, J., and Phelps, D. S. Pulmonary surfactant protein A; structure, expression, and its role in innate host defense. *Update of Intensive Care Medicine*, in press, 2002.
 43. DiAngelo, S., Lin, Z., Wang, G., Phillips, S., Ramet, M., Luo, J., and Floros, J. Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles. *Dis Markers*, 15: 269-81, 1999.

UMA VISÃO CRÍTICA DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Columnista Experto de SIIC
Dr. José Rodrigues Coura, MD, PhD



Pesquisador Titular, Especialista em Doenças Infecciosas e Parasitárias, chefe do Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil

en colaboración con

Solange Lisboa de Castro, PhD, Pesquisadora Titular, Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Otro trabajo publicado: Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA: «Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil», *Trends in Parasitology* 18(4):171-176, Abr 2002

Rio de Janeiro, Brasil. (**especial para SIIC**)

Necessidade de novas drogas para o tratamento da infecção chagásica, que atinge mais de 16 milhões e com mais de 100 milhões de pessoas expostas à infecção na América Latina.

RESUMO

Esta síntese da revisão «A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy», publicada nas *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97:3-24, 2002, por JR Coura e SL de Castro, chama a atenção para a necessidade de novas drogas para o tratamento da infecção chagásica, que atinge mais de 16 milhões e com mais de 100 milhões de pessoas expostas à infecção na América Latina. As duas drogas existentes para tratamento, o nifurtimox e o benznidazol, atuam apenas na fase aguda e recente da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e apresentam grandes limitações pelos seus efeitos colaterais e pela necessidade do seu emprego durante pelo menos 60 dias. Por outro lado o alopurinol e os antifúngicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol, em testes clínicos, mostraram resultados pobres, nulos ou controversos para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas. O desenvolvimento de novas drogas deve visar alvos específicos da estrutura e do metabolismo do *T. cruzi*, os quais devem ser estudados, inicialmente *in vitro*, antes de maiores esforços experimentais. Deve-se correlacionar o alvo a ser atingido com a atividade anti-parasitária da droga e/ou seus derivados, considerando o menor dano possível para a célula do hospedeiro.

Palavras-chave: doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, quimioterapia, tratamento clínico, desenvolvimento de drogas.

Summary

In the «Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy» (Coura & De Castro, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97:3-24, 2002), we call attention for the need of new drugs for Chagas disease treatment. Chagas disease is endemic in Latin America, affecting 16-18 million peoples, with more than 100 million exposed at risk of infection. The two drug, nifurtimox and benznidazole, existing for Chagas disease treatment act mainly in the acute or recent phase of the disease and have a great limitation because its side effects and long term 60 days treatment. On the other hand allopurinol, ketoconazole, fluconazole and itraconazole under experimental screen and clinical tests, showed a very poor, null or controvert results in the treatment chronic phase of Chagas disease.

The devepment of new drugs should look for specific targets of the structure and metabolism of *Trypanosoma cruzi*, first *in vitro* before major experimental effort. It should correlate the target to be reach with the drug and its derivates anti-parasite activities, considering how to

reach the target with a lower host cells damages possible.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, chemotherapy, clinical treatment, drug development.

RISCOS DA DOENÇA

A doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana, descoberta por Carlos Chagas no Brasil, em 1909, é uma zoonose que afeta 16 a 18 milhões de pessoas na América Latina, com mais de 100 milhões de expostos ao risco da infecção.¹ Seu agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae, cujo ciclo evolutivo inclui a passagem obrigatória por hospedeiros vertebrados (numerosas classes de mamíferos, inclusive o homem) e invertebrados (triatomíneos hematófagos dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*). A transmissão da infecção ocorre principalmente por vetores e por transfusão sanguínea e ocasionalmente por via oral ou congênita.

A infecção chagásica apresenta duas fases bem distintas: a fase aguda ou inicial, assintomática na maioria dos casos, oligosintomático ou sintomático com febre, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, conjuntivite unilateral (sinal de Romana), miocardite e meningoencefalite, podendo ser fatal em até 10% dos casos. Esta fase se caracteriza pela presença do *T. cruzi* ao exame direto do sangue, e por responder adequadamente ao tratamento com nifurtimox ou benznidazol, com 70 a 80% de cura. Dois meses aproximadamente após o início da fase aguda, desaparece da corrente sanguínea o *T.*

cruzi ao exame direto, o qual somente será detectado pelo xenodiagnóstico, pela hemocultura ou pela presença do seu DNA na reação em cadeia da polimerase (PCR), entrando o paciente na fase crônica, de difícil cura com as drogas efetivas na fase aguda.

Na experiência brasileira² menos de 10% dos pacientes nessa fase respondem ao tratamento quimioterápico. Após um período de latência na fase crônica de 10 a 15 anos, chamado de forma indeterminada, os pacientes podem evoluir para a forma crônica cardíaca com miocardite crônica, insuficiência cardíaca e morte súbita por arritmia cardíaca e/ou para a forma digestiva, com megaesôfago e megacólon.

TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

A droga ideal para o tratamento da doença de Chagas deveria preencher os seguintes requisitos, segundo a Organização Mundial de Saúde:

- i. promover a cura parasitológica de casos agudos e crônicos
- ii. ser eficaz em dose única ou com poucas doses
- iii. ser de baixo custo e acessível aos pacientes
- iv. não produzir efeitos colaterais ou teratogênicos
- v. não necessitar hospitalização para o tratamento
- vi. não induzir resistência parasitária

Pelo menos os quatro primeiros requisitos citados não foram preenchidos por nenhuma das drogas testadas até o presente. Quase uma centena de drogas já foi testada até o momento com poucos resultados efetivos, entre os quais destacam-se: derivados das quinoleínas, vários antimaláricos, arsenobenzóis e outros arsenicais, fenantridinas, sais de ouro, bismuto, cobre e zinco, iodeto de sódio, violeta de genciana, aminopterina, ácido paraminosalicílico, hidrazida do ácido nicotínico, ACTH e cortisona, derivados da estilomicina, anfotereicim B, mais de 30 antibióticos e alguns nitrofuranos.³

⁶ A primeira demonstração clara de cura experimental da infecção chagásica foi feita por Brener⁷ utilizando a nitrofurazona em esquema de duração prolongada em camundongos, quando curou 95.4% (62/65) dos animais tratados. No final da década de 60 início de 70 surgiram, respectivamente, o nifurtimox e o benznidazol, as primeiras drogas efetivas para

tratamento da fase aguda e recente da infecção chagásica humana, mas com índices de cura muito baixos na fase crônica da doença, necessitando do seu emprego em esquemas de duração prolongada (30 a 60 dias), com importantes efeitos colaterais.^{8,9} Estas drogas, entretanto, são as únicas existentes para uso clínico no presente.

O nifurtimox é o 3 metil-4-(5-nitrofurfurilideno-amino) tetrahydro-4H-1, tiazina-1-1-dióxido. O seu mecanismo de ação foi relacionado ao aumento da produção de anions superóxidos e à ação de radicais livres ao nível de mitocôndrias do parasito.¹⁰ Já o benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) além do mecanismo oxidativo que para essa droga não é chave, atua através de ligação covalente ou outras interações de intermediários da nitroredução com componentes do parasito ou ligação a ADN, lipídeos e proteínas.^{11,12} Os efeitos colaterais no uso clínico do nifurtimox são anorexia, perda de peso, excitabilidade ou sonolência e manifestações digestivas, náuseas, vômitos, cólicas intestinais e diarreia. Os efeitos adversos do benznidazol podem ser classificados em três grupos: (i) sintomas de hipersensibilidade, dermatite com erupção cutânea, edema generalizado, febre e dores musculares e articulares; (ii) depressão da medula óssea, púrpura trombocitopenica e agranulocitose, a mais grave das manifestações; (iii) polineuropatia, parestesias e polineurite de nervos periféricos. Além dos efeitos colaterais a grande desvantagem de ambos os medicamentos é a necessidade do seu uso prolongado (60 dias), a pouca atuação nos casos crônicos e na evolução da doença. Está indicado o tratamento na fase aguda ou recente da infecção, em crianças menores de 12 anos e em casos da fase crônica tardia por indicação médica.

DROGAS EM TESTES CLÍNICOS E EXPERIMENTAIS

Quatro drogas vêm sendo testadas em diferentes formas e esquemas na infecção chagásica: o alopurinol, o cetoconazol, o fluconazol e o itraconazol com resultados pouco promissores. O allopurinol (4-hidroxi-pirazol (3,4-*d*) pirimidina) é um análogo da hipoxantina que impede ou reduz a formação do ácido úrico por inibição da xantina-oxidase e bloqueio da biosíntese *de novo* das purinas, por isso é largamente usado no tratamento da hiperuricemia. Embora alguns estudos iniciais *in vitro*¹³ tenham mostrado sua ação em tripanosomatídeos, estudos em pacientes na fase aguda da doença de Chagas¹⁴ mostraram a sua total ineficácia. Sua atuação na evolução de casos da forma crônica indeterminada e no tratamento da reativação do *T.*

cruzi, após transplante cardíaco e imunossupressão, precisa ser melhor avaliada. Os antifúngicos cetoconazol (nitroimidazol), e os triazólicos fluconazol e itraconazol, têm demonstrado experimentalmente efeito curativo na fase aguda¹⁵, entretanto, experiências realizadas com cetoconazol em casos crônicos da infecção humana¹⁶ e na reativação da doença em casos de AIDS¹⁷, demonstraram a sua ineficácia. Outros estudos clínicos realizados com cetoconazol, fluconazol e itraconazol na fase crônica da doença, também precisam ser melhor avaliados. Estudos recentes com um isômero do fluconazol, composto D 0870, em camundongos infectados com *T. cruzi* na fase aguda e crônica demonstram um efeito supressor do parasito 30 a 50 vezes maior que o obtido com cetoconazol e nifurtimox^{18,19}.

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS

Considerando as limitações das drogas em uso clínico e de poucas perspectivas das drogas em fase experimental e do grande número de pessoas infectadas com o *T. cruzi*, estimado em mais de 16 milhões na América Latina, torna-se indispensável o desenvolvimento de novas drogas.

O desenvolvimento de drogas anti-parasitárias pode emergir da seleção de produtos sintéticos ou naturais, de compostos com estrutura similares a drogas com atividade comprovada, mas sem possibilidade de uso clínico, de produtos utilizados em outras doenças parasitárias semelhantes ou de alvos metabólicos específicos

Todos os alvos de drogas anti-parasitárias devem ser validados pelos seguintes critérios²⁰:

- correlação da inibição do alvo com atividade anti-parasitária da droga e/ou seus derivados *in vitro*, antes de maiores esforços experimentais
- comparação do alvo entre parasitas susceptíveis e resistentes a uma dada droga

- eliminação do gene de transcrição do alvo a ser atingido no parasito.

As dificuldades inerentes a tais abordagens de validação de alvos, ficam muito claras, particularmente no último critério.

Estudos recentes sobre a bioquímica do *T. cruzi*, identificam novos e promissores alvos para quimioterapia da doença de Chagas, entre os quais destacam-se o metabolismo de esteróides, enzimas como tripanotona redutase, cisteína proteinase, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, DNA topoisomerase, dihidrofolato redutase e farnesilpirofosfato sintetase.^{21,22} O problema de desenvolvimento de novas drogas está muito relacionado ao desinteresse das companhias farmacêuticas em investir em drogas de uso limitado a populações de baixa renda em países subdesenvolvidos. Nesse sentido advogamos que as Universidades e Institutos de Pesquisas desses países, com apoio governamental se dediquem a busca de drogas anti-parasitárias, por exemplo para a doença de Chagas, para Leishmanioses e Toxoplasmose, para as quais não existem drogas efetivas, de baixo custo, fácil aplicação e baixa toxicidade.

Duas drogas seriam de grande interesse no momento a serem desenvolvidas para o tratamento da doença de Chagas, o megazol (CL-64855) e o nitroimidazol MK-436, com os quais foram obtidos excelentes resultados experimentais^{23,24} mas que por questões não explicadas não foram desenvolvidas pelas empresas por elas responsáveis, possivelmente pela detecção de ação mutagênica. Este é um claro exemplo do que foi acima mencionado.

REFERÊNCIAS

1. WHO – World Health Organization 1997. Chagas disease. Thirteenth Programme Report UNDP/TDR, Geneve.
2. Cañado JR 2002. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazol. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 44:29-37.
3. Coura JR, Silva JR 1961. Aspectos atuais do tratamento da doença de Chagas. Rev Bras Med 51: 283-290.
4. Brener Z 1968. Terapêutica experimental da doença de Chagas. In Cañado, Doença de Chagas. Belo Horizonte, Imprensa Oficial de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 510-516.
5. Cañado JR 1968. Tratamento da doença de Chagas. In JR Cañado, Doença de Chagas, Imprensa Oficial de Minas Gerais, Minas Gerais, p. 517-540.
6. Coura JR, Castro SL 2002. A Critical Review on Chagas disease Chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97:3-24.
7. Brener Z 1961. Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldéido- semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental pelo Trypanosoma cruzi. Rev Inst Med Trop São Paulo 3: 43-49.
8. Coura JR 1996. Perspectivas actuales del tratamiento específico de la enfermedad de Chagas. Bol Chil Parasitol 51: 69-75.
9. Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W 1997. Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation. Rev Soc Bras Med Trop 30: 139-144.
10. Do Campo R, Moreno SNJ 1986. Free radical metabolism of antiparasitic agents. Fed Proceed 45:2471-2476.
11. Polak A, Richle R 1978. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. Ann Trop Med Parasitol 72: 228-232.
12. Diaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ 1988. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from Trypanosoma cruzi. Experientia 44: 880-881.
13. Marr JJ 1991. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. J Lab Clin Med 118: 111-119.
14. Lauria-Pires L, Castro CN, Emanuel A, Prata A 1988. Ineficácia do allopurinol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas. Rev Soc Med Trop 21: 79
15. De Castro SL 1993. The challenge of Chagas disease chemotherapy: An update of drugs assayed against Trypanosoma cruzi. Acta Trop 53: 83-98
16. Brener Z, Cañado JR, Galvão LM, Da Luz ZM, Filardi LS, Pereira ME, Santos LM, Cañado CB 1993. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the

treatment of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 88: 149-153.

17. Galhardo MCG, Martins, I, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Coelho JMC, Vasconcellos ACV, SantosRibeiro R 1999. Reactivação da infecção por *Trypanosoma cruzi* em paciente com síndrome de imunodeficiência adquirida. Rev Soc Bras Med Trop 32: 291-294.
18. Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lazard K, Piras MM, Piras R, Perez N, Wincker P, Ryley JF 1996. Cure of short- and long-term experimental Chagas disease using D0870. Science 273: 969-971.
19. Molina J, Urbina J, Gref R, Brener Z, Rodrigues Junior JM 2001. Cure of experimental Chagas disease by the bis-triazole DO870 incorporated into "stealth" polyethyleneglycol- polylactide nanospheres. J Antimicrob Chemother 47: 101-104.
20. Wang CC 1997. Validating targets for antiparasite chemotherapy. Parasitology 114 Suppl:S31-44.
21. DoCampo R, Moreno SNJ 2001. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatids and Apicomplexan parasites. Current Drug Targets-Infectious Disorders 1: 51-61.
22. Rodriguez JB 2001. Specific molecular targets to control tropical diseases. Curr Pharm Des 7: 1105-1116.
23. Brener Z, Cañado JR, Galvão LM, Da Luz ZM, Filardi LS, Pereira ME, Santos LM, Cañado CB 1993. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 88: 149-153.
24. Andrade SG, Silva RC, Santiago CM 1989. Treatment of chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections in mice with MK-436, a 2-substituted 5-nitroimidazole. Bull World Health Organ 67: 509-514

BACILOSCOPIA Y CULTIVO EN MUESTRAS DE JUGO GÁSTRICO EN EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR INFANTIL

Columnista Experto de SIIC
Dr. David Gómez Pastrana Durán

Doctor en Medicina, Médico Pediatra y Neumólogo Infantil en el Hospital de Jerez, Jerez de la Frontera, España



en colaboración con

Rafael Torronteras (Microbiólogo y Doctor en Medicina), **Pilar Caro** (Radiólogo), **Antonio María López Barrio** (Radiólogo y Doctor en Medicina), **Pedro Macias** (Infectólogo Infantil), **Anselmo Andres** (Neumólogo Infantil y Doctor en Medicina), **Manolo Pineda** (neumólogo Infantil) y **Juan Navarro** (Pediatra y Doctor en Medicina)

Otro trabajo publicado: Gómez Pastrana D, Torronteras R, Caro P, Anguita ML, López Barrio AM, Andres A, Navarro J: «Comparison of Amplicor, in-house polymerase chain reaction, and conventional culture for the diagnosis of tuberculosis in children», *Clinical Infectious Diseases* 32(1):17-22, Ene 2001.

Jerez de la Frontera, España (**especial para SIIC**)

Si bien la baciloscopia y el cultivo son poco sensibles en las muestras de jugo gástrico de niños con tuberculosis, la tinción directa es un método poco específico y el cultivo requiere varias semanas, son pruebas de obligada realización en niños con sospecha de tuberculosis, pues pueden ser de ayuda inestimable para el clínico y aportan información sobre la sensibilidad a fármacos.

RESUMEN

Objetivo: evaluar el rendimiento de la baciloscopia y el cultivo en muestras de jugo gástrico en la tuberculosis pulmonar infantil. *Método:* estudio prospectivo, controlado y ciego de 421 muestras de aspirado gástrico procedentes de 139 niños remitidos por sospecha de tuberculosis. *Resultados:* la baciloscopia fue positiva en 6 de los 46 niños con tuberculosis activa (sensibilidad 13%) y en 3 de los 93 niños de los grupos de control (especificidad 96.8%). El cultivo fue positivo en 15 pacientes con tuberculosis activa (sensibilidad 32.6%), siendo mayor su rendimiento cuando el parénquima pulmonar estaba afectado en la radiografía de tórax. El *M. tuberculosis* también se aisló en 2 niños con infección tuberculosa sin enfermedad aparente y en uno de ellos se realizó tomografía computarizada, que mostró adenopatías mediastínicas no visibles en la radiografía de tórax. *Conclusiones:* la baciloscopia y el cultivo tienen baja sensibilidad en muestras de aspirado gástrico de niños con tuberculosis pulmonar. La baciloscopia puede presentar falsos positivos.

Algunos niños con infección tuberculosa sin enfermedad aparente presentan actividad microbiológica, eventualmente secundarias a adenopatías mediastínicas no visibles en la radiografía de tórax.

Palabras clave: tuberculosis, infancia, diagnóstico, cultivo, baciloscopia.

SUMMARY

Objective: To evaluate the yield of smears and cultures in gastric juice samples in the diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis. *Methods:* Prospective, controlled and blinded study of 421 clinical samples taken from 139 children referred for evaluation of suspected tuberculosis. *Results:* Smears were positive in 6 of the 46 children with active tuberculosis (sensitivity: 13%) and in 3 of the 93 children of the control groups (specificity: 96.8%).

Cultures were positive in 15 children with active disease (sensitivity 32.6%), and the effectiveness rate was higher when there was parenchymal involvement on the chest radiograph. *M. tuberculosis* was also isolated in 2 children with tuberculous infection who showed no apparent signs of the disease, and in one of them a

CT-scan revealed mediastinal adenopathies which were not evident on the chest radiography. *Conclusion:* Smears and cultures have low sensitivity in gastric aspirate samples of children with pulmonary tuberculosis. Smears can show false positive results. Some children with tuberculous infection without apparent signs of the disease exhibit microbiological activity that can be caused by mediastinal adenopathies which are not evident on chest radiographs.

Key words: tuberculosis, children, diagnosis, culture, smears.

INTRODUCCION

El diagnóstico microbiológico de tuberculosis (TBC) se ha basado tradicionalmente en la baciloscopia y el cultivo. La confirmación de la enfermedad requiere el aislamiento mediante cultivo y la identificación del *Mycobacterium tuberculosis*. Como el cultivo requiere varias semanas, se puede realizar un diagnóstico de presunción mediante detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en el examen directo del frotis al microscopio (baciloscopia). No obstante, el diagnóstico bacteriológico en la infancia no es sencillo, porque predominan las formas de la enfermedad cerradas y con pocos gérmenes y habitualmente se utilizan muestras de jugo gástrico. Por tanto, con frecuencia se realiza un diagnóstico clínico sobre la base de una prueba positiva de la tuberculina, presencia de síntomas sospechosos, hallazgos radiológicos sugestivos e identificación de un adulto contagioso en su entorno.^{1,2} El objetivo de este estudio fue valorar de manera prospectiva el rendimiento de la microscopía directa y del cultivo en aspirados gástricos de niños remitidos por sospecha de tuberculosis, y establecer la relación de la baciloscopia y el cultivo con parámetros clínicos, radiológicos y epidemiológicos de niños con TBC.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron de forma prospectiva durante dos años y medio 421 muestras de jugo gástrico procedentes de 139 niños atendidos en el Hospital Infantil «Virgen del Rocío», de Sevilla, por sospecha de TBC pulmonar, aunque también se incluyó la TBC linfática intratorácica, la TBC pleural y la TBC miliar.

- **Clasificación de los pacientes.** Los pacientes se clasificaron de acuerdo con la valoración de la prueba de tuberculina, el contacto con un enfermo de TBC, los síntomas clínicos, la radiografía (Rx) de tórax y la respuesta al tratamiento:
 - **Grupo 1.** Sin infección tuberculosa, con prueba de tuberculina negativa.
 - **Grupo 2.** Infección tuberculosa sin enfermedad. Niños con tuberculina positiva (induración de al menos 5 mm)¹ sin sintomatología clínica y con radiografía de tórax normal valorada por dos radiólogos pediátricos y un pediatra.
 - **Grupo 3.** TBC con enfermedad clínicamente activa. Para ser incluidos en este grupo, los niños debían presentar hallazgos clínicos y radiológicos compatibles con la enfermedad tuberculosa, mejorar con el tratamiento antituberculoso y cumplir al menos dos de los siguientes criterios:
 1. Prueba cutánea de la tuberculina positiva
 2. Exclusión razonable de otros diagnósticos
 3. Identificación de un caso fuente adulto con enfermedad contagiosa por *M. tuberculosis*.
 - **Grupo 4.** TBC no activa clínicamente. Niños que habían sido diagnosticados y tratados correctamente por TBC pulmonar al menos dos años antes.
 - **Grupo 4.** TBC no activa clínicamente. Niños que habían sido diagnosticados y tratados correctamente por TBC pulmonar al menos dos años antes.
- **Muestras clínicas.** El jugo gástrico se recogió a primera hora de la mañana, tras 10 horas de ayuno. La muestra fue tratada con el método de Tacquet y Tison (homogeneización y descontaminación con lauril sulfato e hidróxido de sodio, y neutralización con solución de ácido ortofosfórico). Se procedió a la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes con la técnica de auramina-rodamina, confirmando los resultados positivos mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. Se realizó cultivo en medio de Löwenstein-Jensen y Coletsos, identificando las micobacterias con sondas de ADN.

Veinte niños no ingresaron en el Hospital y acudieron a las 8:00 de la mañana para la toma de la muestra (11 con infección TBC, 6 con enfermedad TBC, 1 con TBC no activa clínicamente y 2 sin infección TBC). Treinta muestras procedentes de 10 pacientes fueron recogidas en el curso del tratamiento antituberculoso (3 con infección TBC y 7 con enfermedad TBC, dos de los cuales tenían otras muestras antes de iniciar el tratamiento).

- **Análisis estadístico.** Las variables cuantitativas se analizaron con la prueba de la *t* de Student, o de Mann-Whitney si no seguían distribución normal, y las variables categóricas con la prueba del χ^2 o la prueba de Fisher. La normalidad de las variables se estudió con el test de Kolmogorov-Smirnov. La sensibilidad de la baciloscopia y el cultivo se calcularon utilizando los métodos estándar, incluyendo como casos a los niños con *TBC clínicamente activa* y todos los demás como controles. Las diferencias estudiadas se consideraron significativas para un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Resultados globales

Del estudio participaron 139 niños. La edad media fue de 4 años y 5 meses (53.87 ± 38.90 meses; rango 1 mes a 15 años), y el 67.6% no superaba los 6 años. Se encontró fuente de contagio en el 54% de los niños estudiados, fundamentalmente en convivientes (40.3%) (tabla 1).

TABLA 1. Población de estudio.

| | No infección | Infección TBC sin enfermedad | TBC clínicamente activa | TBC no activa clínicamente |
|---|-------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Nº de niños | 51 | 37 | 46 | 5 |
| Muestras clínicas | 151 | 111 | 144 | 15 |
| Muestras por paciente (media \pm DE) | 2.96 \pm 0.28 | 3 \pm 0 | 3.13 \pm 0.65 | 3 \pm 0 |
| Edad en meses (media \pm DE) | 46.27 \pm 33.23 | 69.73 \pm 38.04 | 47.04 \pm 42.32 | 76.80 \pm 31.29 |
| Varón : mujer | 21 : 30 | 15 : 22 | 26 : 20 | 3 : 2 |
| Hospitalizados (%) | 96.1% | 70.3% | 87% | 80% |
| Fuente de contagio identificada (%) | 13 (25.5%) | 26 (70.3%) | 34 (73.9%) | 2 (40%) |
| Conviviente | 6 (11.8%) | 18 (48.6%) | 30 (65.2%) | 2 (40%) |
| No conviviente | 7 (13.7%) | 8 (21.6%) | 4 (8.7%) | 0 |
| Tiempo de exposición en días (media \pm DE) | 114.5 \pm 64.1 | 72.69 \pm 115.23 | 60.33 \pm 52.52 | 0 |
| Tuberculina en mm (media \pm DE) | 0 | 14.35 \pm 3.90 | 16.25 \pm 4.44 | 19 \pm 3.46 |

Cuarenta y seis niños se catalogaron como TBC con *enfermedad clínicamente activa*. Treinta y tres de ellos (71.7%) tenían síntomas clínicos. Las alteraciones radiológicas predominantes fueron el infiltrado pulmonar (52.2%) y la adenopatía hilar o mediastínica sin infiltrado (32.6%); también fueron detectados 5 casos de derrame pleural, una caverna y una TBC miliar.

Treinta y siete niños presentaron *infección tuberculosa sin enfermedad* y en 51 no se evidenció infección tuberculosa (tabla 2). Finalmente se incluyeron 5 niños con *TBC no activa clínicamente*.

TABLA 2. Diagnósticos de los pacientes sin infección tuberculosa.

| Diagnóstico | No. de niños |
|---|--------------|
| Neumonía | 23 |
| Ninguna patología (sólo contacto con TBC) | 8 |
| Virosis | 8 |
| Meningitis | 4 |
| Infección urinaria | 2 |
| Leucemia-linfoma | 2 |
| Varicela | 1 |
| Hemosiderosis pulmonar | 1 |
| Sarcoidosis | 1 |
| Adenoflemón | 1 |

Resultados de la baciloscopia

La tinción directa del frotis del jugo gástrico fue positiva en 6 pacientes con TBC activa (sensibilidad 13%), que radiológicamente presentaron infiltrado pulmonar (n = 4), caverna (n = 1) y adenopatía hiliar sin infiltrado pulmonar (n = 1). Tres niños sin TBC clínicamente activa tuvieron resultado falso positivo de la baciloscopia (especificidad 96.8%).

Resultados del cultivo

El tiempo medio de crecimiento de los cultivos positivos fue de 42 días (rango 19-58 días) y el laboratorio informó ausencia de crecimiento tras 60 días. El cultivo fue positivo en 27 de muestras procedentes de 17 niños. Quince de ellos presentaban *TBC activa* y los otros dos habían sido clasificados clínicamente como *infección TBC sin enfermedad*. En uno de estos dos niños se realizó tomografía computarizada (TC) que demostró la presencia de adenopatías paratraqueales derechas y paraesofágicas de hasta 2 cm de diámetro, no visibles en la Rx de tórax. En consecuencia, el cultivo fue positivo en el 5.4% de los niños catalogados clínicamente de *infección TBC sin enfermedad* (8.3% al excluir a los niños no ingresados o en tratamiento TBC).

La sensibilidad del cultivo en el diagnóstico de *TBC activa*, recogiendo varias muestras por paciente, fue del 32.6% y del 36.6% al excluir a 5 niños en tratamiento antituberculoso. El único factor relacionado de manera significativa con un cultivo positivo fue la alteración del parénquima pulmonar en la Rx de tórax respecto de los que presentaron derrame pleural o adenopatía hiliar o mediastínica sin infiltrado pulmonar ($p = 0.003$) (tabla 3). Otras características se asociaron con un rendimiento del cultivo de al menos el 40% (tabla 4). El estar ingresado cuando se recogió la muestra clínica no aumentó significativamente la sensibilidad del cultivo (37.1% vs. 33.3%).

TABLA 3. Resultados de la baciloscopia y el cultivo considerando el patrón radiológico en 41 niños con TBC clínicamente activa y 34 niños con infección TBC.*

| | n | Baciloscopia+ (%) | Cultivo+ (%) |
|--|----|-------------------|--------------|
| Parénquima pulmonar afectado | 23 | 5 (21.7%) | 13 (56.5%) |
| Infiltrado pulmonar | 21 | 4 (19%) | 11 (52.4%) |
| Caverna | 1 | 1 (100%) | 1 (100%) |
| Miliar | 1 | 0 | 1 (100%) |
| Derrame pleural | 5 | 0 | 0 |
| Adenopatía hiliar o mediastínica sin infiltrado pulmonar | 13 | 0 | 2 (15.4%) |
| Infección TBC (Rx de tórax normal) | 34 | 0 | 2 (5.9%) |

* Excluidos del análisis los pacientes en tratamiento antituberculoso.

TABLA 4. Resultados del cultivo en 41 niños con TBC clínicamente activa considerando factores clínicos y epidemiológicos. *

| | n | Cultivo + (%) | p ** |
|-------------------------------------|----|---------------|------|
| Sintomático | 30 | 12 (40%) | 0.36 |
| Edad menor de 2 años | 11 | 5 (45.5%) | 0.36 |
| Fuente de contagio identificada | 31 | 13 (41.9%) | 0.19 |
| Conviviente como fuente de contagio | 28 | 13 (46.4%) | 0.05 |
| Tuberculina > 17 mm | 19 | 8 (42.1%) | 0.33 |
| Ingresado | 35 | 13 (37.1%) | 0.62 |

* Excluidos del análisis los pacientes en tratamiento antituberculoso.

** Valor de *p* respecto de los que no tienen esta característica.

El número de resultados positivos también fue analizado teniendo en cuenta el orden en la recolección del jugo gástrico. La baciloscopia y el cultivo fueron positivos con más frecuencia en tan sólo una de las tres muestras (tabla 5). Tres de los 6 niños (50%) diagnosticados por microscopia directa tuvieron resultado negativo en la muestra tomada el primer día y positivo en las del segundo o tercer día. Respecto del cultivo, siete de los 17 niños (41.2%) diagnosticados se beneficiaron de la recolección de varias muestras clínicas por paciente, ya que tuvieron cultivo negativo en la primera recolección y positivo en las muestras tomadas en segundo (n = 5) o tercer lugar (n = 2).

TABLA 5. Número de muestras positivas obtenidas en cada niño por la baciloscopia o el cultivo.

| No. de niños con resultados positivos en los diferentes test | No. de muestras positivas en cada niño (%) | | |
|--|--|-----------|-----------|
| | 1 de 3 | 2 de 3 | 3 de 3 |
| Baciloscopia positiva (n = 6) | 4 (66.7%) | 1 (16.7%) | 1 (16.7%) |
| Cultivo positivo (n = 17) | 11 (64.7%) | 2 (11.8%) | 4 (23.5%) |

DISCUSION

El diagnóstico de TBC en la infancia con frecuencia es clínico. Para ello se valoran datos clínicos, radiológicos y epidemiológicos en presencia de una reacción tuberculínica positiva.^{1,2} Es difícil conseguir un diagnóstico microbiológico mediante examen directo o cultivo debido a que, habitualmente en los niños, la enfermedad se presenta de modo paucibacilar. Además, ante la dificultad de obtener esputo, se recurre a la búsqueda del bacilo en el jugo gástrico para recolectar las secreciones pulmonares deglutidas durante la noche. También se ha referido como causas del bajo rendimiento la dificultad del *M. tuberculosis* para sobrevivir en el ambiente ácido del jugo gástrico y los métodos de procesamiento y descontaminación de la muestra clínica antes de ser cultivada.³ Sin embargo, la obtención de lavado broncoalveolar en niños no parece aumentar la sensibilidad diagnóstica respecto de las muestras seriadas de jugo gástrico.⁴ La rentabilidad del examen directo del frotis de jugo gástrico en niños con tuberculosis es muy baja, generalmente menor del 10%.⁵⁻⁹ En este estudio la sensibilidad fue del 13%, incluyendo a un niño con una caverna y dos con afectación endobronquial. La implicación bronquial tras el contacto con una adenopatía tuberculosa favorece el paso de gérmenes al bronquio y su aislamiento en muestras clínicas. Además, la toma de varias muestras por paciente contribuyó al diagnóstico de 3 niños que tuvieron la primera muestra con baciloscopia negativa, pero positiva alguna de las demás. Hay que destacar que tres niños sin tuberculosis tuvieron baciloscopia positiva. En otros estudios se ha referido la posibilidad de falsos positivos del examen directo debido a la presencia de micobacterias saprofitas en el jugo gástrico,^{10,11} mientras que otros autores la consideran una técnica completamente específica de enfermedad tuberculosa.¹²⁻¹⁵ En cualquier caso, la posibilidad de falsos positivos obliga a corroborar siempre el resultado de la baciloscopia con el cultivo y con la historia clínica del paciente. El rendimiento del cultivo en jugo gástrico oscila entre el 25% y 50%^{5,7,16-20} y es mayor en lactantes.²

La recolección de varias muestras en los paciente de este estudio fue fundamental para el diagnóstico de 7 niños con tuberculosis. El tipo de lesión radiológica se asoció significativamente con el resultado del cultivo, ya que los niños con alteración del parénquima pulmonar tuvieron cultivo positivo con más frecuencia que quienes presentaban derrame pleural o adenopatías sin infiltrado pulmonar. Otros factores, tales como ser sintomático, edad menor de 2 años, tuberculina superior a 17 mm, identificar la fuente de contagio y que ésta fuera un familiar conviviente, se asociaron también con mayor sensibilidad del cultivo, lo cual corrobora estudios previos.²⁰⁻²² No se apreciaron diferencias entre las muestras del jugo gástrico tomadas con el paciente ingresado o ambulatorio, si bien sólo se estudiaron 6 pacientes no ingresados con TBC activa y uno tenía una caverna por lo que no es posible extraer conclusiones.

En un estudio reciente no se apreciaron diferencias significativas entre el rendimiento del cultivo en jugo gástrico de los niños que ingresaron (48%) respecto de los no ingresados (37%).²² Si estos datos se confirmaran, la recolección del aspirado gástrico de manera ambulatoria podría reducir los inconvenientes y los costos de la hospitalización.

A pesar de su baja sensibilidad, la toma de muestras para cultivo en niños con TBC puede ser de gran importancia para estudiar el patrón de sensibilidad del *M. tuberculosis* a los distintos fármacos antituberculosos.²³ Si bien se puede utilizar como guía el patrón de sensibilidad de la cepa del adulto que lo contagió, con frecuencia no se conoce previamente la fuente de contagio o si tendrá cultivo positivo.²⁰

Además, no siempre coincide el patrón de sensibilidad en el niño y en su supuesta fuente de contagio.^{20,22,24} Todo ello aconseja la recolección de muestras en niños con TBC, al menos cuando existe riesgo de resistencia a fármacos antituberculosos.

Un factor limitante del cultivo en la práctica clínica es el tiempo de obtención del resultado, que para nuestros pacientes resultó de 42 días de media. Los nuevos sistemas automatizados disminuyen el tiempo de crecimiento a 2-3 semanas, pero no aumentan la sensibilidad. La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una secuencia de ADN del *M. tuberculosis* puede aumentar la sensibilidad^{3,25-27} y su resultado se obtiene en 1-2 días. Un estudio de nuestro grupo en 117 niños remitidos por sospecha de tuberculosis comunicó una sensibilidad de la PCR del 61.3%.²⁸ Sin embargo, cuando evaluamos una PCR comercializada, la sensibilidad disminuyó y aparecieron falsos positivos.²⁹ Por tanto, ante la posibilidad de que la PCR presente falsos positivos y falsos negativos, debería reservarse para casos dudosos o urgentes en laboratorios con experiencia.

Un hallazgo importante de este estudio fue la presencia de cultivos positivos en dos niños clasificados clínicamente de *infección TBC sin enfermedad*. En uno de ellos, al realizar tomografía computarizada se descubrieron adenopatías mediastínicas que habían pasado desapercibidas en la Rx de tórax. En otros estudios de nuestro grupo, ya habíamos puesto de manifiesto que más de la mitad de los niños clasificados como *infección TBC sin enfermedad* tienen adenopatías mediastínicas al realizarse TC y que en éstos se podía detectar actividad microbiológica mediante PCR.^{28,30} Estos hallazgos muestran lo artificial de la distinción entre *infección* y *enfermedad primaria* en la infancia, por ser fisiopatológicamente partes de una acción continua. Sin embargo, no existen estudios que determinen si los niños asintomáticos y con Rx de tórax normal, pero con adenopatías en la TC o con actividad microbiológica revelada por cultivo o PCR, deben ser clasificados y tratados como infección o como enfermedad TBC.³¹ En conclusión, la baciloscopia y el cultivo son poco sensibles en las muestras de jugo gástrico de niños con tuberculosis. La tinción directa es un método rápido pero poco específico y el cultivo requiere varias semanas; pese a ello pensamos que son pruebas de obligada realización en niños con sospecha de tuberculosis, pues pueden ser de ayuda inestimable para el clínico y aportan información sobre la sensibilidad a fármacos. Algunos niños con *infección TBC* sin enfermedad aparente presentan cultivo positivo, y las causas podrían ser adenopatías mediastínicas no visibles en la Rx de tórax. Sin embargo, el significado clínico o la actitud terapéutica en estos niños con adenopatías descubiertas por TC y en las que a veces se detecta actividad microbiológica no están claramente establecidos y se requieren de estudios adicionales.

BIBLIOGRAFIA

1. Grupo de Trabajo sobre Tuberculosis. Consenso nacional para el control de la tuberculosis en España. Med Clin (Barc) 1992; 98: 24-31.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for public health surveillance. MMWR 1990; 39(RR13): 40.
3. Pierre C, Olivier C, Lecossier D, Boussougant Y, Yeni P, Hance AJ. Diagnosis of primary tuberculosis in children by amplification and detection of mycobacterial DNA. Am Rev Respir Dis 1993; 147: 420-424.
4. Abadco DL, Steiner P. Gastric lavage is better than bronchoalveolar lavage for isolation of Mycobacterium tuberculosis in childhood pulmonary tuberculosis. Pediatr Infect Dis J 1992; 11: 735-738.

5. Rosell A, Ruiz J, Monterola JM, et al. Rendimiento de la bacteriología en la tuberculosis pulmonar y pleural infantil. *Arch Bronconeumol* 1992; 28 Supl 1: 51.
6. Snider DE Jr, Rieder HL, Combs D, Bloch AB, Hayden CH, Smith MHD. Tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 271-278.
7. Vidal ML, del Cerro MJ, García de Miguel MJ, et al. Tuberculosis pulmonar en la infancia: a propósito de 149 casos. *An Esp Pediatr* 1990; 32: 15-19.
8. Neu N, Saiman L, San Gabriel P, et al. Diagnosis of pediatric tuberculosis in the modern era. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 122-126.
9. Driver CR, Luallen JJ, Good WE, Valway SE, Frieden TR, Onorato IM. Tuberculosis in children younger than five years old: New York City. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 112-117.
10. Strumpf IJ, Tsang AY, Schork MA, Weg JG. The reliability of gastric smears by auramine-rhodamine staining technique for the diagnosis of tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 1976; 114: 971-976.
11. Laven GT. Diagnosis of tuberculosis in children using fluorescence microscopic examination of gastric washings. *Am Rev Resp Dis* 1977; 115: 743-749.
12. Berean K, Roberts FJ. The reliability of acid fast stained smears of gastric aspirate specimens. *Tubercle* 1988; 9: 205-208.
13. Elcuaz R, Martín N, González T, Rosselló J. Infecciones por micobacterias: rendimiento de la baciloscopia en diferentes muestras clínicas (1975-1988). *Med Clin (Barc)* 1991; 97: 211-214.
14. Bahamman A, Choudhri S, Long R. The validity of acid-fast smears of gastric aspirates as an indicador of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 62- 67.
15. Klotz SA, Penn RL. Acid-fast staining of urine and gastric contents is an excellent indicator of mycobacterial disease. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 1197-1198.
16. Kimerling ME, Vaughn ES, Dunlap NE. Childhood tuberculosis in Alabama: epidemiology of disease and indicators of program effectiveness, 1983 to 1993. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 678-684.
17. Nogales MC, Navarro M, Domínguez MV, Martín E. Valoración de las muestras de jugo gástrico en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar infantil. *An Esp Pediatr* 1995; 42: 115-117.
18. Goodyear HM, Moore-Gillon JC, Price EH, Larcher VF, Savage MO, Wood CBS. Mycobacterial infection in an inner city children's hospital. *Arch Dis Child* 1993; 69: 229- 231.
19. Pomputius WF, Rost J, Dennehy PH, Carter EJ. Standardization of gastric aspirate technique improves yield in the diagnosis of tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 222-226.
20. Starke JR, Taylor-Watts KT. Tuberculosis in the pediatric population of Houston, Texas. *Pediatrics* 1989; 84: 28-35.
21. Vallejo JG, Ong LT, Starke JR. Clinical features, diagnosis and treatment of tuberculosis in infants. *Pediatrics* 1994; 94: 1-7.
22. Lobato MN, Loeffler AM, Furst K, Cole B, Hopewell PC. Detection of Mycobacterium tuberculosis in gastric aspirates collected from children: hospitalization is not necessary. *Pediatrics* 1998; 102: E40.
23. Gómez-Pastrana D, López MD, Ortiz J. Tuberculosis pulmonar multirresistente en un preescolar. *Arch Bronconeumol* 1999; 35: 413-414.
24. Steiner P, Rao M, Mitchell M, Steiner M. Primary drug-resistant tuberculosis in children. Correlation of drug-susceptibility patterns of matched patient and source case strains of Mycobacterium tuberculosis. *Am J Dis Child* 1985; 139: 780-782.
25. Smith KC, Starke JR, Eisenach K, Ong LT, Denby M. Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction. *Pediatrics* 1996; 97: 155-160.
26. Muñoz C, Gené A, Pérez I, Mira A, Rocal J, Latorre C. Diagnóstico de la tuberculosis en niños. Evaluación de la técnica reacción en cadena de la polimerasa. *An Esp Pediatr* 1997; 47: 353-356.
27. Delacourt C, Poveda JD, Chureau C, et al. Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. *J Pediatr* 1995; 126: 703-709.
28. Gomez-Pastrana D, Torronteras R, Caro P, et al. Diagnosis of tuberculosis in children using a polymerase chain reaction. *Pediatr Pulmonol* 1999; 28: 344-351.
29. Gomez-Pastrana D, Torronteras R, Caro P, et al. Comparison of Amplicor, in-house PCR and conventional culture in the diagnosis of tuberculosis in children. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 17-22..
30. Gómez-Pastrana D, Caro P, Torronteras R, et al. Tomografía computarizada y reacción en cadena de la polimerasa en la infección tuberculosa de la infancia. *Arch Bronconeumol* 1996; 32: 500-504.
31. Khan EA, Starke JR. Diagnosis of tuberculosis in children: increased need for better methods. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 115-123.

DESTACAN LOS LOGROS ALCANZADOS EN EL CONTROL DE LA MALARIA

Dr. Carlos Catão Prates Loiola

Especialista en Salud Pública y en Malaria; Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ. Profesional del Area de Enfermedades Transmisibles y no Transmisibles de la Organización Panamericana de la Salud en Brasil.

Ultimo trabajo publicado: *Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001*, Revista Panamericana de Salud Pública 11(4):235-244, 2002.

Brasilia, Brasil (**especial para SIIC**)

La incidencia de la malaria se ha reducido en Brasil en los últimos años, como consecuencia de la implementación de nuevos programas de control, en el marco de la iniciativa *Roll Back Malaria* de la Organización Mundial de la Salud. El **doctor Carlos Catão Prates Loiola** destacó estos logros en una entrevista exclusiva con **SIIC**.

El **doctor Carlos Catão Prates Loiola** es especialista en malaria, y se desempeña en el Area de Enfermedades Transmisibles y no Transmisibles de la representación en Brasil de la Organización Panamericana de la Salud. Además, es miembro del Comitê de Pesquisas do CENEPI/FUNASA, y del Comitê Técnico Assessor para o Programa de Controle da Malária. Ha publicado numerosos trabajos de investigación, en la Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, en la Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, y en la Revista Panamericana de Salud Pública, entre otras.

De acuerdo con el experto, los progresos logrados en el control de la malaria hasta el año 2000 fueron modestos, debido a que las acciones iniciadas no fueron sostenidas. En 2000 se lanzó un programa intensificado, en el marco de la iniciativa *Roll Back Malaria* de la OMS.

Entre 1998 y 1999, explicó el investigador, se registró un aumento del 34% en el número de casos en la región amazónica. El programa se inició con el objetivo de reducir en un 50% el número de casos para el año 2001, y en un 50% la mortalidad, en 2002. Hasta el momento, los datos estadísticos muestran que, en 2001, el número de casos se redujo en un 39%.

El **doctor Carlos Catão Prates Loiola** explicó estas observaciones en un diálogo exclusivo con **SIIC**.

SIIC: Qual é a epidemiologia (atual e no passado) da malária no Brasil?

Dr. Carlos Catão Prates Loiola: Em cerca de 80% do território brasileiro há possibilidade de transmissão da malária, pela presença do vetor. Na década de 1940 estimou-se a incidência em 6 000 000 de casos por ano. Este número foi gradativamente sendo reduzido graças ao controle da doença, chegando a 52 000 casos ao final dos anos 1960.

A partir daí, a incidência da malária se concentra na região amazônica (99.7%), onde se distribui de forma heterogênea em função de movimentos populacionais. Nos últimos anos o número de casos cresceu chegando em 1999 ao ápice de 630 985 casos.

Entretanto, em 2001 apresentou uma redução de 39% com o registro de 383 654 casos

SIIC: Quais programas, e com quais características, foram desenvolvidos desde 1965 para enfrentar esta enfermidade?

C.C.P.L.: Em 1965, a Campanha de Erradicação da Malária, com características fortemente verticalizadas, com ênfase ao combate ao mosquito vetor e que durou até 1982. De 1982 a 1992 varias iniciativas de controle foram empregadas.

Em 1992 implanta-se o Controle Integrado da Malária com ênfase no diagnóstico e tratamento precoces, porém ainda de forma centralizada. A partir de 2000 o controle integrado passa a ser horizontalizado com planejamento, organização, execução e avaliação pelos níveis municipais ou estaduais e com o apoio técnico e financeiro do governo federal.

SIIC: Poderia descrever o programa desenvolvido como parte da iniciativa de Roll Back Malaria da OMS?

C.C.P.L.: A partir de 2000 houve mobilização política e social e articulação intersetorial como preconiza a iniciativa de *Roll Back Malaria* (RBM). Dentro da iniciativa de RBM estão previstas ações de mobilização política e social, articulação intra e intersetorial e cooperação entre países em áreas de fronteira.

Programa brasileiro tem caminhado neste sentido. O plano elaborado, na sua fase de construção, teve uma ampla participação de todos os setores técnicos e políticos dos três níveis de governo.

No seu lançamento contou com o apoio e a presença física do Senhor Presidente da República, que anunciou o início da operação e contou, ainda, na ocasião com as presenças dos Senhores Ministros da Saúde, do Meio Ambiente e da Reforma Agrária, dos Presidentes do IBAMA e do INCRA e de todos os Governadores de Estado da Região Amazônica.

Estava, assim, incluída na agenda política dos Governos Federal e Estaduais o Controle da Malária como uma prioridade a ser enfrentada. Além disto o programa tem conseguido articular-se com outras áreas dentro do Ministério da Saúde, veja o exemplo da inserção do mesmo dentro do Departamento de Ações Básicas de Saúde, DAB/MS, nos programas de Agentes Comunitários de Saúde, PACS, e Programa de Saúde da Família, PSF. Também tem alcançado a articulação com outros setores fora do MS, como por exemplo com o Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária, INCRA, e o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente, IBAMA, e tem patrocinado uma série de reuniões entre países para intercâmbio da cooperação técnica em áreas estratégicas e de fronteira.

SIIC: De que forma esta nova iniciativa resolveu as deficiências de programas anteriores?

C.C.P.L.: Através do fortalecimento das estruturas locais e permanentes de saúde, com garantia de repasse automático de recursos financeiros, com periodicidade mensal e com uma visão epidemiológica local que permite avaliar, com muito mais rapidez e eficiência as situações locais de transmissão e uma definição das medidas mais adequadas de controle.

SIIC: Como se planeja continuar com este programa?

C.C.P.L.: Consolidando o processo de descentralização, transformando o programa de controle em atividade integrada e regular dos serviços permanentes de saúde. Este processo foi pactuado entre os três níveis de governo.

A política de saúde do Brasil está regulamentada em Lei, consta da Constituição Federal e tem muito claramente definidas as responsabilidades e atribuições de cada nível de governo – Federal, Estadual e Municipal -. Desta forma, o que se pretende é fazer cumprir a lei, inserindo definitivamente o Controle da Malária no Sistema Único de Saúde – SUS. As medidas concretas planejadas para garantir a continuidade das ações de controle da malária estão baseadas na descentralização do planejamento, organização e execução das ações pelos serviços permanentes de saúde e equipes móveis de agentes de controle de endemias, agentes comunitários de saúde e equipes de saúde da família.

Um outro elemento importante é a garantia da transferência regular e automática de recursos financeiros do Governo Federal, independentemente de convênios, para Estados e Municípios. Da mesma forma está estabelecido o papel do Governo Federal no apoio técnico e no fornecimento de insumos básicos para tratamento, diagnóstico e controle de vetores.

SIIC: Quais resultados esperaria obter nos próximos anos? Crê que a erradicação da malária é um objetivo alcançável?

C.C.P.L.: Espera-se reduzir ainda mais a incidência da doença, particularmente dos casos produzidos por *Plasmodium falciparum* e, conseqüentemente a gravidade da doença e o número de óbitos. Além disto, espera-se interromper a transmissão da malária em áreas urbanas da região amazônica. Foi pactuado, entre os três níveis de governo, uma redução de 20 a 30% o número de casos da doença para 2002 em relação a 2001. Com relação a erradicação não nos parece um objetivo alcançável a curto e médio prazos nas áreas rurais da região amazônica brasileira.

O programa de controle da malária no Brasil tem diferentes objetivos de acordo com a situação epidemiológica atual. Nas áreas endêmicas: interrupção da transmissão em áreas urbanas; redução da incidência em áreas rurais com população estável; controle de epidemias em áreas rurais com população instável; redução da gravidade dos casos e da letalidade por malária por meio de diagnóstico e tratamento oportuno e adequado. Nas áreas da Exta-Amazônia: prevenir, detectar e controlar, precocemente, focos de transmissão introduzida; evitar a mortalidade por malária com diagnóstico imediato e tratamento adequado.

Si bien el objetivo de erradicar la malaria no podrá alcanzarse en los próximos años, el doctor Carlos Catão Prates Lóiola destaca los logros obtenidos hasta el momento por los programas de control de esta enfermedad en Brasil.