

## Expertos Invitados

### ● UREAPLASMA SPP. SINDROMAS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL



Columnista Experta de SIIC  
**Dulce María Pinto Domingues**

Estudiante de doutoramento. Campo de especialização Microbiologia.

#### Introdução

Os micoplasmas, termo usado não só para descrever os microrganismos do género *Mycoplasma*, mas também todos os pertencentes à classe *Mollicutes*, são caracterizados pela ausência de parede celular, pelo seu pequeno genoma e pela sua simplicidade estrutural. Como não têm parede são muito frágeis e pleomórficos. O seu pequeno genoma é responsável pelo limitado número de vias metabólicas que possuem, o que se traduz numa complexidade de requisitos nutricionais, dificultando a sua manipulação laboratorial.<sup>1</sup>

A existência de ureaplasmas, inicialmente denominados micoplasmas T (tiny) devido ao facto de produzirem colónias pequenas, foi reconhecida em 1954, sendo então designados por *Ureaplasma urealyticum*, dada a sua capacidade de hidrolizar a ureia.<sup>2</sup> Desde essa altura, tem sido identificado no cérvix ou na vagina de 40%-80% das mulheres sexualmente activas assintomáticas, sendo esta percentagem mais baixa nos homens.<sup>3,4</sup> É presentemente indiscutível a sua capacidade de originar ou estar associado a doença nos seres humanos.

Conhecem-se 14 serotipos de *U. urealyticum*, que foram agrupados em dois biovars: parvobiovar (devido ao pequeno tamanho do seu genoma), o mais frequente, que inclui os serotipos 1, 3, 6 e 14, e o biovar 2 ou T960, que compreende os restantes serotipos.<sup>5-7</sup> Para além do tamanho dos seus genomas, os dois biovars distinguem-se com base em diferentes perfis electroforéticos de proteínas em gel de poliacrilamida uni e bidimensionais, homologia DNA-DNA, diferentes padrões de restrição por digestão com endonucleases, padrões de RFLP distintos, diferentes sensibilidades ao manganésio, etc.<sup>6-8</sup>

Em 2001, Robertson et al, classificaram os 2 biovars como sendo espécies diferentes, não só pelas características anteriores, mas sobretudo devido ao facto de possuírem sequências nucleotídicas divergentes de vários genes altamente conservados, o que veio provar a distinção filogenética entre os 2 biovars e consequentemente a criação de 2 espécies: *U. parvum*, correspondente ao parvobiovar, e *U. urealyticum*, antigo T960.<sup>9,10</sup>

#### Serotipos

*U. parvum* é isolado mais frequentemente, mas alguns estudos sugerem que *U. urealyticum* é a espécie mais prevalente em mulheres com doença inflamatória pélvica (DIP) e corrimento vaginal.<sup>4</sup> Mais recentemente, também alguns serotipos têm sido mais associados a doenças que outros.<sup>11</sup> Por exemplo, o serotipo 4 é mais frequente em recém-nascidos com complicações e o serotipo 8 em mulheres com gravidez de risco.<sup>4</sup> Além disso, tem sido sugerido que um anticorpo-serotipo-específico pode ser necessário para protecção contra doenças invasivas causadas por este microrganismo.<sup>12</sup> Estudos preliminares sugeriram que a capacidade de invasão não está relacionada apenas com um serotipo, parecendo ser mediada por outras propriedades inerentes a todos, como a capacidade de alterar facilmente os antigénios de superfície.<sup>12</sup> Assim, alterações num antigénio de superfície, o antigénio de múltiplas bandas (MBA), responsável pela variabilidade de *Ureaplasma* spp, podem reflectir-se na capacidade de alguns serotipos evitarem o sistema

imunitário e passar do estado comensal ao estado patogénico.<sup>12</sup> O antígeno de múltiplas bandas foi já caracterizado fenotipicamente, revelando ser específico de espécie, contendo não só epitopos específicos de serotipo, mas também originando reacções cruzadas, sendo produzido quer in vivo, quer in vitro.<sup>13</sup> As variações deste antígeno parecem ser determinantes importantes da virulência de *Ureaplasma* spp.<sup>14,15</sup> A sequência do gene que codifica para este antígeno é já conhecida para o serotipo 3 de referência, mostrando que o MBA contém um péptido sinal e um local de acilação na região N-terminal, enquanto que a região C-terminal é composta por múltiplas unidades de repetição em "tandem", incluindo epitopos específicos de serotipo.<sup>15</sup> Alterações no número de cópias das unidades de repetição resultam numa variação de tamanho do gene.<sup>12,13,15</sup>

### **Locais de colonização e epidemiologia**

Os ureaplasmas, tal como os micoplasmas em geral, residem nas superfícies mucosas do aparelho respiratório e urogenital. Limitam-se, na sua maioria, à superfície epitelial, raramente penetrando a submucosa. São extracelulares, podendo contudo algumas espécies de micoplasmas localizar-se intracelularmente.<sup>16</sup>

Embora o local primário de colonização seja o aparelho urogenital inferior, graças ao recente desenvolvimento das técnicas de PCR tem sido possível localizar *Ureaplasma* spp. noutros locais do corpo humano. A colonização por parte destes microrganismos está relacionada com a idade jovem, com o baixo estatuto económico, com a actividade sexual com parceiros múltiplos, com a etnia negra e com o uso de anticoncepcionais orais.<sup>17</sup>

### **Manifestações clínicas**

*Ureaplasma* spp. pode ser encontrado na vagina de 40% a 80% das mulheres sexualmente activas assintomáticas, sendo esta percentagem mais baixa nos homens.<sup>3,4</sup> É presentemente indiscutível a sua capacidade de originar uretrite não gonocócica (UNG), complicações durante a gravidez e doenças nos recém-nascidos, aumentando o risco de nascimento prematuro.<sup>2,7,8,14</sup> Tem-se demonstrado que este microrganismo apresenta uma elevada prevalência no aparelho genital de mulheres grávidas.<sup>8</sup> Assim, de acordo com determinados factores de risco, 43.3% a 81.1% destas mulheres são colonizadas por *Ureaplasma* spp., tendo sido sugerido por alguns autores como responsável por complicações na gravidez, morbidade e mortalidade neonatal, endometrite, corioamnionite, ruptura prematura de membranas, parto prematuro, recém-nascidos com baixo peso (< 1.5 kg), febre pós-parto e pós-aborto e por pneumonia e meningite em recém nascidos com muito baixo peso.<sup>8,11,18-20</sup> A passagem deste agente para a cavidade amniótica tem sido apontada como sendo um importante factor para o prognóstico da gravidez: a presença deste microrganismo no líquido amniótico tem sido sugerida como o maior factor de risco, embora o diagnóstico, na maioria dos casos, não se execute ou não seja de todo efectuado.<sup>21,22</sup> Este micoplasma é o mais frequentemente isolado, quer a partir do líquido amniótico, quer da placenta de mulheres com gravidez pré-termo com ou sem membranas intactas ou com pré-termo com ruptura prematura de membranas.<sup>21-23</sup> Alguns estudos relatam cultura positiva de *Ureaplasma* spp. a partir de líquido amniótico de mulheres assintomáticas no 2º trimestre de gravidez, tendo a falta de terapêutica nessas mulheres sido considerada um risco para a gravidez (parto prematuro).<sup>21,22</sup>

É também o microrganismo mais frequentemente isolado a partir do aparelho respiratório de recém-nascidos prematuros,<sup>21,23</sup> podendo ser responsável por hipertensão pulmonar persistente, doença crónica do pulmão,<sup>4,14</sup> displasia broncopulmonar,<sup>4</sup> aborto espontâneo,<sup>20</sup> infertilidade,<sup>20</sup> infecção crónica do sistema nervoso central<sup>4</sup> e septicemia.<sup>24</sup>

Foi isolado no líquido cefalorraquidiano (LCR), tendo-lhe sido atribuída a responsabilidade de ocasionar sequelas neurológicas, assim como tem sido também associado a cálculos urinários, prostatites, epididimites, artrites (principalmente em doentes hipogamaglobulinémicos com poliartrite reactiva destrutiva), síndrome de Reiter, a infecção disseminada em imunocomprometidos, DIP e a vaginose bacteriana.<sup>22,25</sup>

### **Colheita de produtos biológicos: transporte e sua manutenção**

Quase todos os produtos biológicos podem ser submetidos a identificação de *Ureaplasma* spp., atendendo à natureza da condição clínica. Assim, produtos líquidos como sangue, líquido sinovial, LCR, urina, secreções prostáticas, secreções vaginais ou cervicais, saliva, líquido pleural, secreções da traqueia e nasofaríngeas, podem ser laboratorialmente processados. Pode ainda diagnosticar-se este agente a partir de placenta, tecidos provenientes de autópsia ou biópsia, etc, desde que se suspeite de infecção por este microrganismo.<sup>26,27</sup>

Devido à frágil natureza destes agentes, especial cuidado deve ser tido na colheita dos produtos

biológicos, no transporte, na qualidade do meio de cultura e na conservação.<sup>26</sup>

Para a colheita de exsudados, apenas se devem utilizar zaragatoas de Dacron, de alginato de cálcio ou de poliéster. Como não possuem parede, e tal como os outros micoplasmas, os ureaplasmas são extremamente sensíveis às condições ambientais, particularmente à secagem, às alterações osmóticas, etc, não devendo ser sujeitos a flutuações ambientais.<sup>26,27</sup>

No caso dos produtos biológicos líquidos, não é necessário meio de transporte se forem inoculados em meio de cultura, num período de tempo não superior a 1 h após a colheita.<sup>26</sup> Se os produtos permanecerem à temperatura ambiente sem serem inoculados em meio de transporte, pode haver uma redução significativa da viabilidade destes agentes e crescimento de bactérias contaminantes.<sup>26</sup> Os meios SP2, tripticase de soja com soro e de Stuart podem ser usados como meio de transporte. As amostras clínicas devem ser guardadas a 4°C, se o seu transporte para o laboratório se processar dentro de 24 h. Se isto não for possível, devem guardar-se a -70°C e serem transportadas em gelo.

## Diagnóstico laboratorial de ureaplasmas

### *Cultura*

Os ureaplasmas, assim como os micoplasmas em geral, são microrganismos nutricionalmente fastidiosos, podendo não ser possível produzir um meio de cultura óptimo que permita o crescimento de todas as espécies ou de todas as estirpes da mesma espécie.<sup>26,27</sup>

O caldo Shepard 10B pode ser utilizado para o crescimento de *M. hominis* e de *Ureaplasma spp.*, assim como a gelose A7. O caldo de azul de bromotimol (B Broth) tem também sido recomendado para o isolamento primário de *Ureaplasma spp.*, permitindo ao mesmo tempo o crescimento de *M. hominis*, sendo contudo o caldo Shepard's 10 B o mais utilizado.<sup>26,27</sup> Os meios líquidos incluem um indicador de pH (vermelho de fenol) e ureia, entre outros componentes. Com o metabolismo da ureia, o pH sobe, verificando-se uma alteração da cor do meio de amarelo-alaranjado para vermelho-framboesa, sem que haja turvação do mesmo. Os meios sólidos devem incluir MnSO<sub>4</sub>, de modo a poder-se visualizar as colónias ao microscópio (Amp = 100x), aparecendo estas castanhas. Os caldos devem ser incubados a 37°C em aerobiose e os meios de gelose a 37°C, numa atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> e visualizados diariamente durante 1 semana.<sup>27</sup>

Para estes dois micoplasmas genitais existem meios comerciais que, para além da cultura permitem a quantificação e a avaliação da sensibilidade a alguns dos antibióticos mais comuns no tratamento de infecções do foro genital.<sup>3,27,28</sup>

### *Testes serológicos*

Existem 2 tipos de testes serológicos: o primeiro compreende os testes de inibição do crescimento ou de funções metabólicas, os quais são específicos, mas pouco sensíveis. No entanto, aqueles que se baseiam na inibição do metabolismo ou micoplasmicidas são suficientemente específicos para identificar os agentes e são também os mais sensíveis, embora estejam no limiar de detecção dos anticorpos. O 2º tipo consiste na imunofluorescência em colónias. O maior problema destas técnicas é a existência de vários serotipos, pois a maioria dos testes serológicos reage especificamente com um anticorpo, sendo necessários uma bateria de antisoros.<sup>29</sup>

### *Técnicas baseadas na PCR*

Tal como para os outros micoplasmas, encontram-se descritas várias técnicas de PCR que permitem não só a detecção de *Ureaplasma spp.*, como também a distinção entre as suas 2 espécies. As mais conhecidas têm como alvo o gene 16SrRNA,<sup>4</sup> o gene do antígeno de bandas múltiplas (mba)<sup>30</sup> e o gene da urease.<sup>31</sup>

### *Serotipagem*

Embora existam cada vez mais dados científicos indicando que apenas alguns serotipos causam doença, não existem até à data métodos de serotipagem disponíveis para uso na rotina laboratorial. Contudo, o desenvolvimento de tecnologias baseadas na PCR, tais como a técnica de AP-PCR<sup>32</sup> e de PCR-SSCP,<sup>33</sup> permitem já a biotipagem. A serotipagem utilizando anticorpos monoclonais começa também a ser possível.<sup>34</sup>

## Discussão

É cada vez mais notória a evidência de que os ureaplasmas podem ser agentes ou co-factores de doença humana. No entanto, ainda muito poucos laboratórios fazem o seu diagnóstico de rotina. Para além disso, não existe um procedimento "standard" para o diagnóstico destas infecções, o que muitas vezes dificulta o seu diagnóstico e a investigação nesta área. Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas tecnologias tem tornado cada vez mais acessível a associação destes agentes a várias patologias. Embora as associações encontradas ainda não sejam suficientes para esclarecer definitivamente o seu papel em vários síndromas clínicos, torna-se necessário saber

quais os serotipos mais patogénicos e em que patologias estão implicados, pelo que a necessidade de mais estudos sobre estes microrganismos se torna premente. Tal como anteriormente mencionado, a eventual confirmação da associação de determinados serotipos a síndromas específicos não deve ser esquecida. O desenvolvimento de uma técnica de PCR multiplex ou de real-time PCR que em duas reacções, uma para *U. parvum*, outra para *U. urealyticum*, detectasse todos os serotipos existentes, seria também um grande avanço no conhecimento e na compreensão destes agentes.

Los autores no manifiestan conflictos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Miles RJ, Nicholas RA. Introduction. From methods in molecular biology, vol 104: Mycoplasma protocols, edited by R J Milles and R A J Nicholas, Humana Press Inc. 1998. Totowa, NJ. Pag. 1-5.
2. Taylor-Robinson D, Furr PM. Update on sexually transmitted mycoplasmas. Lancet, 1998 351 (suppl III):12-15.
3. Clegg A, Passey M, Joannes M et al. High rates of genital mycoplasma infection in the highlands of Papua New-Guinea determined both by culture and by a commercial detection kit. J Clin. Microbiol, 1997, 35 (11):197-200.
4. Abele-Horn M, Wolff C, Dressel P et al. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. J Clin Microbiol, 1997, 35(5):1199-1202.
5. Kong F, James G, Zhenfang MA et al. Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*— support for the establishment of a new species *Ureaplasma parvum*. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49:1879-889.
6. Harasawa R, Kanamoto Y. Differentiation of two biovars of *Ureaplasma urealyticum* based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer region. J Clin Microbiol, 1999, 37(12):4135-38.
7. Echahidi F, Muyldermans G, Lawers S et al. Development of monoclonal antibodies against *Ureaplasma urealyticum* serotypes and their use for serotyping clinical isolates. Clin Diagnost Lab Immunol, 2000, 7(4):563-567.
8. Davis JK, Crouse DT, Robertson JA et al. The role of *Ureaplasma urealyticum* in human reproductive and neonatal diseases. Infect Dis Rev, 1999, 1(3):200-207.
9. Kong F, Sillis M, Robertson JA. Molecular genotyping of human *Ureaplasma urealyticum* species based on multiple-banded antigen (MBA) gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50(5):1921-9.
10. Robertson J, Stemke G, Davis JRJ et al. Proposal of *Ureaplasma parvum* sp. nov. and emended description of *Ureaplasma urealyticum* (Shepard et al. 1974) Robertson et al. 2001. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52:587-597.
11. Povlsen K, Thorsen P, Lind I. Relationship of *Ureaplasma urealyticum* biovars to the presence or absence of bacterial vaginosis in pregnant women and to the time to delivery. Eur J Clin Microbiol, 2001, 20(1):65-7.
12. Zheng X, Lau K, Frasier M et al. Epitope mapping of the gene of the variable repetitive region within the MB antigen of *Ureaplasma urealyticum*. Clin Diagnost Lab Immunol, 1996, 3(6):774-78.
13. Zheng X, Teng LJ, Watson HL et al. Small repeating units within the antigen of *Ureaplasma urealyticum* MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. Infect Immun, 1995, 63(3):891-98.
14. Nelson S, Matlow A, Johnson G et al. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in endotracheal tube aspirates from neonates by PCR. J Clin Microbiol, 1998, 136(5):1236-1239.
15. Kong F, Zhu X, Wang W et al. Comparative analysis and serovar-specific identification of multiple- banded antigene genes of *Ureaplasma urealyticum* biovar 1. J Clin Microbiol, 1999, 37(3):538-543.
16. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62 (4):1094-1156.
17. Hussain AI, Robson WLM, Kelley R et al. *Mycoplasma penetrans* and other mycoplasmas in urine of Human Immunodeficiency Virus- positive children. J Clin. Microbiol, 1999, 37 (5):1518-1523.
18. Luki N, Lebel P, Boucher M et al. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1998, 17:255-263.
19. Cordova CMM, Cunha RAF. Importância da pesquisa de Micoplasmas no trato urogenital. Laes&haes, 1999, 121:110-124.
20. Naessens A, Poulon W, Breynaert J et al. Serotypes of *Ureaplasma urealyticum* isolated from normal pregnant women and patients with pregnancy complications. J Clin Microbiol, 1988, 26 (2):319-322.
21. Aaltonen R, Jalava J, Laurikainen E et al. Cervical *Ureaplasma urealyticum* colonization: comparison of PCR and culture for its detection and association with preterm birth. Scand J Infect Dis, 2002, 34:35-40.
22. Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P et al. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. J Infect Dis, 2003, 187:518-521.
23. Manimtim W, Hasday J, Hester L et al. *Ureaplasma urealyticum* modulates endotoxin-induced cytokine release by human monocytes derived from preterm and term newborns and adults. Infect Immun, 2001, 69 (6):3906- 3915.
24. Cunningham C, Bonville C, Hagen J et al. Immunoblot analysis of anti- *Ureaplasma urealyticum* antibody in pregnant women and newborn infants. Clin Diagn Lab Immunol, 1996, 3 (5):487-492.
25. Baseman JB, Tully JG. Mycoplasmas: Sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. Emerg Infect Dis, 1997; 3 (1):21-31.
26. Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA et al. Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections, 34 In: Cumitech Eds. ASM press 2001:1-29.
27. Taylor P. Medical significance of mycoplasmas. In: Milles RJ, Nicholas RAJ, eds. Methods in molecular biology, vol 104: Mycoplasma protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc 1998: 7-12.
28. Domingues D, Tavira L, Duarte A et al. Genital mycoplasmas in women attending a family planning clinic in Guine-Bissau and their susceptibility to antimicrobial agents. Acta Trop 2003; 86 (1):19-24.
29. CD dst

30. Domingues D, Tavira L, Duarte A et al. *Ureaplasma urealyticum* biovar determination in women attending a family planning clinic in Guiné-Bissau, using Polymerase Chain Reaction of the multiple-banded antigen gene. J Clin Lab Anal, 2002, 16:71-75.
31. Blanchard A, Hentschel J, Duffy L et al. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerise chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. Clin Infect Dis, 1993, 17 (suppl 1):S148-53.

---

## EL VERAPAMILO ES EL AGENTE TERAPEUTICO OPTIMO PARA LA ENFERMEDAD DE PEYRONIE



Columnista Experto de SIIC  
Dr. Laurence Levine

Professor of Urology.

En los últimos diez años el verapamilo surgió como el agente médico terapéutico óptimo para la enfermedad de Peyronie. ¿Es esto cierto? De ser así, ¿cómo sucedió?

La investigación con verapamilo para el tratamiento de la enfermedad de Peyronie se inició en 1991 con un ensayo de dosis crecientes realizado por Levine y col. en *University of Chicago Hospitals*.<sup>1</sup> Este primer ensayo en seres humanos se basó en años de investigación previa que demostró los efectos de los bloqueantes de los canales de calcio en los fibroblastos de varias especies y sistemas de órganos no peneanos, usando modelos *in vitro*. A principios de los '90, aún no se habían desarrollado técnicas confiables para cultivar fibroblastos de la enfermedad de Peyronie. Desde entonces, varios laboratorios fueron capaces de mantener fibroblastos derivados de placas de Peyronie en cultivo, para poder estudiarlos *in vitro*.<sup>1,3</sup> Anderson y col. examinaron el efecto de los bloqueantes de los canales de calcio en los fibroblastos derivados de placas de enfermedad de Peyronie. Estas células fueron expuestas a varios modificadores biológicos, incluidos verapamilo, interferón alfa, colchicina y prostaglandina E1.<sup>4</sup> En esos experimentos se obtuvieron las menores tasas de proliferación luego de la exposición a verapamilo, lo que confirma su efecto antiproliferativo en los fibroblastos derivados de placas de enfermedad de Peyronie. Al mismo tiempo, los experimentos *in vitro* mostraban el efecto de los bloqueantes de los canales de calcio en la supresión de la actividad de muchas citoquinas que se sabe están activas durante la cicatrización de heridas, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de necrosis tumoral, las interleuquinas 6 y 8 y el factor de transformación de crecimiento beta.<sup>5,6</sup>

La investigación previa realizada por Kelly, Aggeler y Dietrich demostró la capacidad de los bloqueantes de los canales de calcio, y en particular del verapamilo, para alterar la producción de moléculas de matriz extracelular por los fibroblastos, incluidos colágeno, fibronectina y glucosaminoglucanos, los componentes primarios de la placa de Peyronie.<sup>7-9</sup> Por lo tanto, la justificación del uso de verapamilo en la enfermedad de Peyronie parece estar bien fundada y hasta el día de hoy el verapamilo surge como el agente científicamente útil para producir cambios en la placa de Peyronie.

La cuestión subyacente que ha quedado sin responder es: ¿Cuál es el nivel tisular terapéutico *in vivo* para que el verapamilo produzca los cambios deseados en la síntesis de matriz de colágeno extracelular? Los estudios de Lee y Ping informan que el nivel sérico alcanzado durante el tratamiento oral de la hipertensión con verapamilo está en el rango de 0.01 a 0.2 micromoles. Pero la concentración para retardar la síntesis de matriz de colágeno extracelular en su estudio *in vitro* fue de aproximadamente 100 micromoles.<sup>10</sup> En ese estudio se concluyó que el tratamiento oral con bloqueantes de los canales de calcio no podría producir niveles satisfactorios sin crear toxicidad y por lo tanto es necesaria la administración intralesional de la droga mediante inyecciones. El primer estudio en utilizar verapamilo intralesional para la enfermedad de Peyronie, publicado en 1994, fue un ensayo no controlado de dosis crecientes, en el que se limitó la dosis de verapamilo a 10 mg. Se utilizó esa dosis máxima porque se la consideró la máxima dosis segura que podía ser administrada en forma intravenosa, según lo determinara la industria farmacéutica.<sup>1</sup> Un informe reciente no publicado demostró que es seguro el uso de 20 mg por inyección (comunicación personal con Larry L. Lipshultz, Houston, Texas). Hasta que se revisen otros informes, 10 mg continúa siendo la máxima dosis recomendada por inyección. En mi experiencia con más de 700 pacientes que recibieron tratamiento de hasta 12 inyecciones, no hubo efectos colaterales

cardiovasculares.

Teloken y col. demostraron indirectamente la importancia de la inyección intralesional, al no encontrar ventaja en la administración de verapamilo sobre placebo cuando la droga se inyectaba con técnica perilesional. Este estudio apoya la importancia de la exposición adecuada a la droga por parte de los fibroblastos de la placa.<sup>12</sup>

La justificación científica del uso de verapamilo continúa sin cambios y parece estar apoyada por el limitado número de estudios clínicos publicados hasta el momento.<sup>1,13-17</sup> Pero el tejido humano cicatrizal es más bien inhóspito respecto de la remodelación y resolución. Se espera que las investigaciones que se realicen en la fisiopatología de la enfermedad de Peyronie brinden información clave que permita una terapia más específica para corregir la formación de cicatriz y el proceso de remodelación. Nuestra meta final es comprender la cicatrización de heridas y revertirla, una vez establecida. Esta es una tarea desalentadora, y si bien se han hecho algunos avances, aún no hay un método no quirúrgico confiable que pueda revertir una cicatriz formada. Por lo tanto, en este momento, parecería que deberíamos considerar el uso de la terapia con verapamilo ya que tiene fundamento científico, produce poco o nada de daño, es económica y es mínimamente invasiva, hasta que surja una mejor alternativa. El no hacer nada es como esconder la cabeza en la tierra y puede además permitir la progresión y el empeoramiento de la deformación.

El debate académico respecto del uso de verapamilo continúa centrado en la falta de ensayos controlados de inyecciones de verapamilo *versus* placebo. Este tópico se trató en un artículo previamente publicado.<sup>17</sup> Claramente, los ensayos de diseño controlado aleatorizado constituyen la prueba definitiva de eficacia, pero en ciertas circunstancias esto no es posible o éticamente justo, especialmente cuando no hay un estándar efectivo de cuidado con el que comparar, y cuando el tratamiento con placebo puede ser potencialmente doloroso, invasivo y perjudicial. Mi discusión con bioestadísticos indica que los estudios de diseño no aleatorizado, conocidos como estudios cuasi experimentales, son alternativas razonables cuando no es aceptable realizar ensayos controlados por placebo. A su modo, estos estudios pueden ser controlados y estadísticamente válidos.<sup>18</sup> De los estudios previos varios pueden satisfacer el criterio de diseño cuasi experimental, ya que el protocolo de tratamiento es el mismo para todos los pacientes. Las características demográficas y las mediciones objetivas se obtienen en el mismo intervalo en todos los sujetos. Técnicos ciegos al estudio realizan estos análisis, reduciendo por lo tanto el sesgo.<sup>16,17</sup> El único estudio ciego informado de inyección de verapamilo *vs.* solución salina, realizado por Rehman y asociados, fue pequeño (n = 14) y de corto plazo (promedio de seguimiento de 6 meses), pero demostró mejoras en la función eréctil, el contorno y la disminución del volumen de la placa en el grupo de verapamilo respecto del placebo.<sup>15</sup> De todos modos no se vio que la disminución en la deformidad fuera significativa entre los dos grupos. Más recientemente se utilizó la terapia combinada con verapamilo de "manera controlada", el verapamilo fue la variable. Los estudios demostraron una mejora alta y estadísticamente significativa y, de acuerdo con los autores, clínicamente importante, en la deformidad y funcionamiento sexual en los grupos de tratamiento con verapamilo.<sup>19,20</sup> La discordancia entre los resultados se puede atribuir a diferencias en la técnica, dosis, frecuencia de inyección e intervalo, así como a la población de pacientes estudiada. Otras preocupaciones respecto del efecto del verapamilo incluyen la cuestión de si la remisión espontánea de la enfermedad de Peyronie es responsable de la disminución observada en la deformidad. En la literatura actual hay dos estudios que controlan la historia natural de este trastorno, e informan de un 7% a 13% de resoluciones espontáneas de la tasa de curvatura.<sup>21,22</sup> En los tres artículos publicados por nuestro grupo acerca de la terapia de inyección de verapamilo para la enfermedad de Peyronie, notamos una mejora en la curvatura medida objetivamente en el rango de 40% a 60%.<sup>1,16,17</sup> Estas tasas claramente exceden las de remisión espontánea arriba mencionadas. Por lo tanto parece muy improbable que la recuperación espontánea sea responsable de la mejora observada luego del tratamiento con verapamilo. Otro factor que hubiera sido útil estudiar, pero que cuestiones prácticas y éticas hacen difícil, es la contribución del propio proceso de inyección. No hay estudios de la enfermedad de Peyronie o de otros tratamientos de cicatrices en la bibliografía que sugieran que el trauma de la aguja de por sí pueda "terminar" con la cicatriz o pueda producir su remodelación. Si bien éste es un cuestionamiento teórico a la eficacia de la técnica de inyección del verapamilo, no existe información práctica o científica que apoye este concepto.

También hay que mencionar la técnica de inyección intralesional de verapamilo, que cuando se realiza en forma correcta optimizará los resultados y reducirá los efectos colaterales. Este enfoque ha sido criticado por ser doloroso e invasivo. Es claramente invasivo como lo es una inyección, pero no debería ser doloroso, ya que se debería suministrar a todos los pacientes bloqueo peneano apropiado, que típicamente se logra con 10 a 20 cc de bupivacaína al 0.5% sin epinefrina. Una vez

completada la anestesia, se logra mejor ingreso a la placa por un abordaje lateral, intentando atravesar la placa, pero debajo del paquete neurovascular. La técnica consiste en inyectar la droga en la placa usando la técnica de múltiples pasajes luego de una única punción en la piel. Si la placa es grande, puede ser necesaria una segunda o tercera punción en la piel. El objetivo es distribuir la droga en la placa, depositándola en los surcos creados por la aguja. No consiste en romper la placa con la aguja o la fuerza del líquido. No es raro que el paciente presente equimosis luego de la inyección. Para reducir esto, se recomienda que el sujeto ejerza una compresión suave con el pulgar en el sitio de la inyección, por un mínimo de 5 a 10 minutos. Yo he tratado con éxito pacientes que consumían aspirinas, cumarina u otros antiacoagulantes sin que hubiera incremento significativo de la equimosis o hematoma. Estos pacientes deben comprimir el sitio de la inyección por al menos 10 minutos luego de realizada. Si bien se utiliza una técnica de múltiples punciones y pasajes de aguja es de destacar que muy pocos pacientes en mis 13 años de experiencia con esta terapia se han quejado de dolor postratamiento luego de 24 horas, y la mayoría experimenta muy poco dolor luego de que el anestésico local deja de actuar. Se permite a los pacientes reiniciar la actividad sexual a las 24 horas luego de la inyección.

Una observación recurrente es que en muchos hombres (40% a 50%) la placa parece volverse más prominente y cambia de tamaño y localización durante el tratamiento. Esto es probable que se deba a la inyección de la droga en la placa, yo considero que cualquier cambio es una buena señal. La mayoría de los pacientes observará que la placa es cada vez más pequeña en los 6 a 18 meses posteriores a la finalización del programa de inyecciones, lo que también puede acompañarse de disminución de la deformidad. Estos cambios pueden reflejar el proceso de remodelación cicatrizal, que en una persona normal se estima que toma entre 6 y 24 meses.

En un análisis previo encontramos que 75% de los pacientes que mejoraron la deformidad (contorno o curvatura) luego de 12 inyecciones tenían evidencia de mejora luego de la sexta inyección. Por lo tanto hemos instituido un ensayo de 6 inyecciones de verapamilo.<sup>16</sup> Si no hay mejoría es improbable que más inyecciones tengan algún beneficio en el paciente. Si la placa es estable luego de 6 inyecciones, pero la deformidad sigue siendo un impedimento para el coito, se recomienda el enderezamiento quirúrgico.

¿Cuándo se debe iniciar la terapia con verapamilo? La respuesta es: lo más pronto posible. Este es el momento en que el tejido es más activo respecto del proceso cicatrizal. También es el momento en que el tratamiento quirúrgico no está recomendado. Por otro lado, en pacientes con enfermedad estable, en los informes que realizamos en 1997 y 2000, encontramos que aun en aquellos con deformidad estable por hasta 7 años puede haber disminución de la curvatura en una tasa similar a la de los que tienen enfermedad de duración más corta.<sup>16,17</sup> Por lo tanto, cualquier paciente que concorra a mi consultorio con enfermedad de Peyronie, sin importar la duración de la enfermedad, y que no esté psicológicamente preparado o interesado en la cirugía, es candidato a inyección intralesional de verapamilo.

Finalmente, me gustaría tratar el tema del uso tópico de verapamilo. El verapamilo tópico en crema se puede adquirir en EE.UU. desde hace varios años. Desafortunadamente, ningún investigador independiente ha publicado ensayos controlados con placebo. Los laboratorios sugieren que hay una alta tasa de mejora en la deformidad y función sexual. Hasta que se pueda realizar un ensayo controlado apropiado con verapamilo tópico en crema no puedo recomendar ese tratamiento. En un estudio importante de Martin y col. se examinó el nivel de verapamilo encontrado luego de la aplicación en el pene de la crema de verapamilo que existe en el mercado, por un mínimo de 12 horas.<sup>23</sup> Estos pacientes estaban programados para implantación quirúrgica de prótesis peneana. Durante la cirugía, se realizó la escisión de una porción de la túnica albugínea subyacente al sitio de aplicación del verapamilo tópico, para evaluar la concentración. No se encontró verapamilo en ninguna de las muestras tomadas. En mi opinión, es improbable que se pueda lograr una concentración adecuada de verapamilo en la placa de Peyronie luego de su aplicación tópica, dado que la droga debe penetrar la piel, dartos y fascia de Buck antes de llegar a la túnica albugínea.

Por otro lado, se demostró que hay liberación transcutánea de verapamilo con la ayuda de bajos niveles de corriente eléctrica. Con la administración electromotriz de drogas (EMDA), una forma de iontoforesis, se aplicó una solución de verapamilo en la piel suprayacente a la placa de Peyronie, justo antes de realizar una cirugía de enderezamiento, con escisión parcial de la placa e injerto pericárdico.<sup>24</sup> En ese estudio se colocaron 10 ml de solución de verapamilo en un reservorio sobre la placa y se realizó una sesión estándar de 20 minutos de EMDA. Los pacientes fueron sometidos a enderezamiento quirúrgico con escisión parcial de la placa para evaluación de la concentración de verapamilo. En el estudio, 72% de las muestras tenían niveles mensurables de la droga. Los niveles encontrados fueron muy diferentes, con un rango de 1% a 23% de los encontrados en una

placa a la que se inyectó el verapamilo en forma directa. Esto renueva la preocupación y la pregunta sin responder, cuál es la concentración de la droga necesaria para producir cambios en la placa. Este estudio fue realizado porque dos informes previos de trabajos en Austria e Italia, no controlados, que utilizaron verapamilo en solución con dexametasona, notaron disminución de la deformidad en pacientes tratados con el sistema EMDA.<sup>25,26</sup> En los estudios, 37% y 88% de los hombres, respectivamente, notaron que mejoró la curvatura. Como resultado del experimento que demostró que se pueden obtener niveles mensurables de verapamilo en la túnica albugínea, así como de los estudios europeos antes mencionados, estamos realizando un ensayo, controlado con placebo, de EMDA con el dispositivo Physion (Mirandola, Italia), usando verapamilo solo vs. solución salina. El informe preliminar se presentó en la *American Urological Association* en 2003, y se encontraron niveles similares de mejoras en la curvatura en los grupos de verapamilo y placebo (52% verapamilo vs. 63% solución salina).<sup>27</sup> El número de sujetos incluidos en este informe preliminar fue pequeño (21 pacientes). Este estudio aún se está realizando, y se esperan nuevos informes. La mejora en ambos grupos se puede explicar por el hecho de que se vio que la corriente eléctrica mejora la cicatrización de heridas. Esto estuvo presente en la bibliografía médica por más de 100 años. Los mecanismos por los cuales los campos eléctricos pueden mejorar la cicatrización incluyen la migración directa de células, el aumento de la síntesis de proteínas, cambios morfológicos en los fibroblastos, así como posibles efectos bacteriostáticos y bactericidas.<sup>28</sup> La disminución en la deformidad que notaran en el estudio EMDA de la *Rush University* no fue tan significativo como los que nosotros informamos luego de la inyección de verapamilo, donde la mejora promedio luego de las inyecciones fue de 30 grados (rango 5 a 75 grados), comparado con 17 grados (rango 10 a 30) en el ensayo con EMDA. Por lo tanto, en nuestra práctica habitual ofrecemos terapia EMDA a los hombres que tienen una curvatura de leve a moderada (es decir, de menos de 40 grados) y que no pueden o prefieren no someterse al protocolo de inyecciones. Actualmente la FDA aprobó en EE.UU. el tratamiento en el hogar con el dispositivo EMDA Physion. El tratamiento se realiza dos veces por semana durante tres meses. Para los hombres que están interesados en una terapia más agresiva o que tienen una curvatura más pronunciada, pero que no desean o no están preparados para someterse a cirugía, se recomienda el programa de inyección intralesional de verapamilo. También tenemos un grupo de pacientes que están realizando el programa de EMDA en la casa combinado con una inyección de verapamilo cada 2 semanas. En conclusión, aún continúa el esfuerzo por encontrar un tratamiento no quirúrgico efectivo para el paciente con enfermedad de Peyronie. Hubo pocos avances en la última década desde que se empezó a utilizar el verapamilo. Casi todos los tratamientos orales fueron ineficaces en los ensayos controlados con placebo.<sup>29</sup> Claramente es necesario elaborar otros enfoques no quirúrgicos. El verapamilo continúa siendo el agente científicamente probado para el tratamiento de la enfermedad de Peyronie, y hay evidencia de mejora en la mayoría de los hombres tratados. Puede que nunca exista un tratamiento que funcione en todos los pacientes con enfermedad de Peyronie, dada la limitación de los cambios en las cicatrices. Hasta que se planteen otras opciones disponibles, el tratamiento intralesional con verapamilo y la terapia transdérmica con EMDA parecen ser seguras y se ha demostrado repetidas veces que disminuyen la deformidad del pene en erección. El autor no manifiesta conflictos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Levine LA, Merrick PF, Lee RC. Intralesional verapamil injection for the treatment of Peyronie's disease. *J Urol* 1994; 151: 1522-1524.
2. Mulhall JP, Anderson MS, Lubrano T, et al. Peyronie's disease cell culture models: phenotypic, genotypic and functional analyses. *Int J Impot Res* 2002; 14 (5): 397-405.
3. Vernet D, Ferrini MG, Valente E, et al. Effect of nitric oxide on fibroblast differentiation into myofibroblast in cell cultures from the Peyronie's fibrotic plaque and in its rat model in vivo. *Nitric oxide* 2002; 7: 262-76.
4. Anderson MS, Shankey TV, Lubrano T, et al. Inhibition of Peyronie's plaque fibroblast proliferation by biologic agents. *IJIR* 2000; 12 (suppl 3): 525-531.
5. Roth M, Eickelberg O, Kohler E, et al. Calcium-channel blockers modulate metabolism of collagens with the extracellular matrix. *Proc Nat Acad Sci* 1996; 93: 5478-5483.
6. Rodler S, Roth M, Nauck M, et al. CA<sup>(2+)</sup>-channel blockers modulate the expression of interleukin-6 and interleukin-8 genes in human vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2295-2298.
7. Kelly RB. Pathways of protein secretion in eukariots. *Science* 1985; 230: 25-32.
8. Aggler J, Frisch SM, Werb Z. Changes in cell shape correlate with collagenase gene expression in rabbit synovial fibroblasts. *J Cell Biol* 1984; 98: 1662-1667.
9. Dietrich, J.W. and Duffield, R.: Effects of the calcium antagonist verapamil on in vitro synthesis of skeletal collagen and non-collagen protein. *Endocrinology*-1979 105: 1168-1972.



10. Lee RC, Doong H, Jellama AF. The response of burn scars to intralesional verapamil. Report of Five Cases. Arch Surg 1994; 129: 107-109.
11. Shin D, Dodge JS, Lo KS, et al. An improved regimen of intralesional verapamil injection therapy in the treatment of Peyronie's disease. J Urol 2004 abstract in print.
12. Teloken C, Vaccaro F, DaRos C, et al. Objective evaluation of non-surgical approach for Peyronie's disease. J Urol 1996; 155: 633A (Abstract 1290).
13. Arena F. Clinical effects of verapamil in the treatment of Peyronie's disease. Acta Biomed Ateneo Parmense 1995; 66: 269-272.
14. Lasser A, Vandenberg TL, Vincent MJ, et al. Intraplaque verapamil injection for treatment of Peyronie's disease. J of the Louisiana State Med Soc 1998; 150: 431- 434.
15. Rehman I, Benet A, Melman A. Use of intralesional verapamil to dissolve Peyronie's disease plaque: a long-term single-blind study. Urol 1998; 51(4): 620- 626.
16. Levine LA. Treatment of Peyronie's disease with intralesional verapamil injection. J of Urol 1997; 158: 1395-1399.
17. Levine LA, Goldman K, Greenfield J. Experience with intraplaque injection of verapamil for Peyronie's disease. J Urol 2002; 168: 621-626.
18. Shadish WR, Cook TD, Campbell DT. Experimental and quasi-experimental designs for generalized causal inference. Houghton-Mifflin: Boston, 2002.
19. Mirone V, Imbimbo C, Palmieri A, et al. Our experience on the association of a new physical and medical therapy in patients suffering from induratio penis plastica. Eur Urol 1999; 36: 327-330.
20. Cavallini G, Biagiotti G, Loverech et al. Oral propionyl-L-carnitine and intraplaque verapamil in the therapy of advanced and resistant Peyronie's Disease. BJU Int 2002; 89: 895-900.
21. Gelbard MK, Dorey F, James K. The natural history of Peyronie's disease. J Urol 1990; 144: 1376-9.
22. Kadioglu, A., Tefekli, A., Sanly, O., et al: Lessons learned from 307 men with Peyronie's disease. J Urol 2001, 165: suppl 202, abstract 838.
23. Martin DJ, Badwan K, Parker M, et al. Transdermal application of verapamil gel to the penile shaft fails to infiltrate the tunica albuginea. J Urol 2002; 168 (16): 2483-2485.
24. Levine LA, Estrada CR, Shou W, Levine. Tunica albuginea tissue analysis following electromotive drug administration (EMDA). J. Urol in 2003.
25. Riedl CR, Plas E, Engelhardt P, et al. Iontophoresis for treatment of Peyronie's disease. J Urol 2000; 163: 95-99.
26. Montorsi F, Salonia A, Guazzoni G, et al. Transdermal electromotive multi-drug administration for Peyronie's disease. Preliminary results. J Androl 2000; 21: 85-90.
27. Levine LA and Sevier VL. A double-blind study, placebo controlled trial of electromotive drug administration (EMDA) using verapamil versus saline for Peyronie's disease. Preliminary Results. J Urol 2003; 169: 4 (suppl), 274.
28. Ojingwa JC and Isseroff RR. Electrical stimulation of wound healing. J Invest Derm, 2002; 121: 1-12.
29. Levine LA. Review of current nonsurgical management of Peyronie's disease. Int. J Impot Research 2003; 15: Suppl 5, S113-S120.