

Hipogamaglobulinemia como fator de risco para infecção por *Cryptococcus neoformans*: a propósito de dois casos

Hypogammaglobulinemia as predisposing factor for *Cryptococcus neoformans* infection: regarding two cases

Roberto da Justa Pires Neto, Márcia Cristina Guimarães, Maria Janete Moya,
Fabiola Reis Oliveira, Paulo Louzada Júnior e Roberto Martinez

Resumo Dois pacientes HIV-soronegativos com doença criptocócica refratária à terapia antifúngica convencional foram submetidos a estudo do sistema imune. Hipogamaglobulinemia foi evidenciada em ambos e associada à alteração funcional da imunidade mediada por células. Hipogamaglobulinemia é considerada como um possível fator predisponente para infecção criptocócica. A importância dos anticorpos no controle da infecção por *Cryptococcus neoformans* é discutida.

Palavras-chaves: Hipogamaglobulinemia. *Cryptococcus neoformans*. Criptococose. Imunoglobulina.

Abstract Two HIV-seronegative patients with cryptococcal disease refractory to conventional antifungal therapy were submitted to an evaluation of the immune system. Hypogammaglobulinemia was found in both and associated with abnormal function of cell-mediated immunity. Hypogammaglobulinemia is considered as a possible predisposing factor for cryptococcal infection. The importance of the antibodies on the control of *Cryptococcus neoformans* infection is discussed.

Key-words: Hypogammaglobulinemia. *Cryptococcus neoformans*. Cryptococcosis. Immune globulin.

A infecção por *Cryptococcus neoformans* é doença fúngica cada vez mais comum na prática clínica, ocorrendo com maior frequência em indivíduos imunocomprometidos. Número considerável de evidências conferem à resposta imune, mediada por células, papel fundamental na defesa do hospedeiro contra esta doença^{7 19}. Por outro lado, evidências de estudos *in vitro* e em animais experimentais têm demonstrado que a imunidade mediada por anticorpos também atua na defesa contra infecções por *C. neoformans*. As atividades biológicas já observadas e

atribuídas aos anticorpos anticapsulares são várias e incluem fixação do complemento, opsonização, potencialização da atividade antcriptocócica de células *natural killer*, dentre outras^{12 14 15}. O papel da imunidade humoral na doença criptocócica tem sido tema de inúmeros estudos visando uma melhor compreensão de sua fisiopatologia, bem como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas^{5 6 16 17}.

A hipogamaglobulinemia é uma alteração da imunidade caracterizada por baixos níveis séricos de anticorpos, podendo se associar a

Divisão de Moléstias Infecciosas e Tropicais e Divisão de Imunologia do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Endereço para correspondência: Prof. Roberto Martinez. Departamento de Clínica Médica/FMRP/USP. Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre, 14048-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Fax: 55 16 633-6695.

Recebido para publicação em 16/2/00.

amplo espectro de doenças infecciosas e não infecciosas^{2,22}. A infecção por *C. neoformans* associada a imunodeficiência humoral é uma condição pouco descrita na literatura. A descrição de casos de pacientes com esta associação pode

contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia desta micose. São relatados dois casos de doença criptocócica em pacientes com deficiência da imunidade representada por hipogamaglobulinemia.

RELATO DOS CASOS

Caso 1. Mulher de 35 anos, branca, com diagnóstico de meningite criptocócica estabelecido em janeiro de 1997 em outro serviço médico, foi admitida no Hospital das Clínicas da FMRP-USP, em novembro de 1997. Já havia recebido tratamento com anfotericina B com dose acumulada de 2.000mg. À admissão, relatava queixas, há 3 meses, de cefaléia frontal, tonturas, vertigens, diminuição progressiva da acuidade visual e anosmia. Não havia história de exposição a *C. neoformans*. Relatava quadros gripais freqüentes nos últimos anos. Exame neurológico não evidenciou alterações e não havia sinais de irritação meníngea. O hematócrito foi 33% e a contagem de leucócitos 14.400/mm³, com 93% neutrófilos, 1% bastonetes e 6% linfócitos. Exame radiológico dos pulmões revelou infiltrado intersticial infra-hilar à direita. Tomografia computadorizada (TC) de crânio evidenciou lesão hipodensa expansiva em região de núcleos da base à esquerda, com importante efeito de massa e com captação anelar na fase contrastada. A glicemia de jejum foi de 95,4mg/dl. A pesquisa de anticorpos anti-HIV em soro (ensaio imunoenzimático) resultou negativa em mais de uma ocasião. Iniciou-se, então, novo tratamento com anfotericina B até que medidas anti-edema cerebral permitissem punção líquórica. Após 1.000mg de dose acumulada de anfotericina B, foi realizada punção da região suboccipital para retirada de líquido cefaloraquidiano (LCR) que evidenciou 2,0 células/mm³, proteína 10mg/dl e glicose 69mg/dl. Estruturas fúngicas compatíveis com *C. neoformans* foram observadas através da Tinta da China e a pesquisa de antígeno criptocócico por aglutinação do látex foi positiva em título de 1/2. Decidiu-se, então, dar continuidade ao tratamento com anfotericina B. Após 1.400mg de dose acumulada, foi necessário mudar tratamento para fluconazol oral (400mg/dia) devido a nefrotoxicidade induzida pela anfotericina B. Houve regressão da cefaléia e da tontura, mas persistência da anosmia e da alteração da acuidade visual. Após intervalo de 3 meses, em março de 1998, a paciente voltou a apresentar queixa de cefaléia associada a dificuldade para escrever e diminuição da acuidade auditiva a direita. Nova TC de crânio revelou aumento da lesão intracerebral.

Decidiu-se, então, pela realização de biópsia estereotáxica. Estudo histopatológico confirmou diagnóstico de encefalite fúngica. Cultura do fragmento da biópsia e de LCR resultou em isolamento de *C. neoformans*. Novo tratamento com anfotericina B foi instituído e avaliação da imunidade foi conduzida, sendo diagnosticada hipogamaglobulinemia. Em dezembro de 1998, teve diagnóstico de tuberculose pulmonar, sendo iniciado tratamento com esquema I (rifampicina, isoniazida e pirazinamida). Em janeiro de 1999, foi iniciada reposição intravenosa mensal de imunoglobulina humana (0,4g/kg), evoluindo, a partir de então, com melhora clínica e controle da infecção fúngica. Tratamento para tuberculose foi prolongado até agosto de 1999, completando nove meses. Os sintomas neurológicos regrediram, com exceção de perda total da acuidade visual a esquerda. Não houve normalização da função renal. A paciente segue em ambulatório mantendo-se 200mg/dia de fluconazol e reposição mensal de imunoglobulina, o que proporcionou a normalização dos níveis séricos de IgG e IgA.

Caso 2. Homem de 51 anos, branco, teve diagnóstico de criptococose pulmonar e de SNC feito em outro serviço em setembro de 96. O diagnóstico foi baseado em exame micológico direto positivo e isolamento de *C. neoformans* a partir de líquido pleural e líquido. Exame de ressonância magnética revelou lesões em parênquima cerebral e cerebelar sugestivas de encefalite. Relatava história de exposição a dejetos de pombos algumas semanas antes do início dos sintomas. Recebera tratamento com anfotericina B (2.000mg de dose acumulada) e fluconazol (200mg/dia por 3 meses), com melhora parcial dos sintomas. Em fevereiro de 97, o paciente voltou a apresentar quadro de cefaléia, tremores de extremidades, diplopia, turvação visual e escotomas. Com este quadro, iniciou seguimento no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Ao exame, observou-se hemiparesia à direita, diminuição de murmúrio vesicular e frêmito tóraco-vocal em base do hemitórax esquerdo e hepatomegalia. O hematócrito foi 37,6% e a contagem de leucócitos 4.800/mm³ com 54% neutrófilos, 2% bastonetes, 3% eosinófilos, 5%

basófilos e 36% linfócitos. Radiografia de tórax evidenciou hipotransparência de padrão alveolar em 1/3 inferior do parênquima pulmonar esquerdo e TC de crânio revelou múltiplas lesões expansivas esparsas pelo parênquima cerebral e cerebelar, associados a edema perilesional. A glicemia de jejum foi de 80,6mg/dl e a pesquisa de anticorpos anti-HIV em soro (ensaio imunoenzimático) resultou negativa em mais de uma ocasião. Novo tratamento com anfotericina B foi instituído. Ao todo, recebeu 8.050mg de dose acumulada, sendo 3.200mg em formulação convencional (50mg/dia), seguido de 4.850mg em formulação liposomal (2,5mg/kg/dia) devido a nefrotoxicidade induzida pela primeira. Foi liberado para seguimento ambulatorial com discreta hemiparesia direita e em uso de fluconazol 200mg/dia. Uma avaliação detalhada

da imunidade foi conduzida, sendo diagnosticada hipogamaglobulinemia. Reposição intravenosa mensal de imunoglobulina humana (0,4g/kg) foi instituída em junho de 1998, obtendo-se estabilidade clínica, controle da infecção fúngica e normalização dos níveis séricos de IgG e IgM. O paciente segue em acompanhamento ambulatorial, em uso de fluconazol 200mg/dia.

Avaliação da imunidade e resultados. A avaliação dos diversos componentes da imunidade foi realizada em ambos os pacientes mediante técnicas padronizadas. Avaliou-se separadamente a fagocitose, a atividade do complemento, a imunidade humoral e a imunidade celular levando-se em consideração aspectos quantitativos e qualitativos. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Os valores das imunoglobulinas, obtidos

Tabela 1 - Avaliação das subpopulações de linfócitos e da hipersensibilidade retardada.

Componentes	Paciente 1	Paciente 2	Valores normais
Linfócitos e subpopulações			
linfócitos totais (cél./mm ³)	1.600	1.400	1.100-3.000
linfócitos T CD4+ (cél./mm ³)	608	595	400-1.700
linfócitos T CD8+ (cél./mm ³)	432	463	200-800
linfócitos B CD19+ (cél./mm ³)	160 (10%)	294 (21%)	5-15%
relação CD4/CD8	1,4	1,3	1,2-4,5
Hipersensibilidade retardada			
Testes cutâneos			
PPD	-	-	
tricotitina	-	NR	
candidina	NR	15mm	
histoplasmina	NR	13mm	
estreptoquinase	10mm	NR	
Dinitroclorobenzeno (DNCB)	ausência de resposta	ausência de resposta	

NR = não reator

Tabela 2 - Avaliação das imunoglobulinas, complemento e fagocitose.

Componentes	Paciente 1	Paciente 2	Valores normais
Imunoglobulinas			
gamaglobulinas (g%)	0,6	0,3	0,6-1,1
IgG (mg/dl)	659	349	830-2040
IgM (mg/dl)	18	35	52-212
IgA (mg/dl)	48	< 30	80-476
Complemento			
C4 (mg/dl)	36	16	10-40
C3 (mg/dl)	155	151	50-90
Fagocitose			
redução de Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	84%	92%	> 70%

após reposição intravenosa, são apresentados na Tabela 3. As dosagens de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), componentes do complemento (C3 e C4) e a quantificação das subpopulações de linfócitos T foram determinadas mais de uma vez, não se observando discrepância nos valores. A dosagem sérica das imunoglobulinas foi realizada por imunodifusão radial. Os níveis séricos de complemento foram dosados por nefelometria. A fagocitose foi avaliada através do teste de redução de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) pelos neutrófilos estimulada por endotoxina bacteriana. As contagens das subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) e de linfócitos B (CD19+) foram realizadas por citometria de fluxo

e a avaliação funcional da imunidade celular realizada através de testes intradérmicos usando antígenos comuns e teste intradérmico com dinitroclorobenzênio (DNCB). O teste com DNCB foi realizado mediante aplicação do produto a 2%, seguida de provocação com o mesmo a 0,05% no décimo quarto dia, e leitura 48 horas após a provocação¹.

Constatou-se, em ambos os casos, níveis subnormais de imunoglobulinas séricas. Observou-se ainda, para os dois casos, resposta parcial aos testes cutâneos de hipersensibilidade tardia e ausência de resposta ao teste com DNCB. Os demais parâmetros imunológicos estavam dentro dos limites de normalidade.

Tabela 3 - Níveis séricos de imunoglobulinas antes e após reposição intravenosa.

Imunoglobulinas (mg/dl)	Paciente 1		Paciente 2		Níveis normais
	antes	após	antes	após	
IgG	659	1596	349	1017	830-2040
IgM	18	45	35	97	52-212
IgA	48	87	< 30	43	80-476

DISCUSSÃO

Cryptococcus neoformans é um fungo encapsulado, saprófita, com distribuição mundial, sendo encontrado no solo, especialmente aquele contaminado com excretas de pássaros. Infecção pelo *C. neoformans* se dá através da inalação de partículas fúngicas aerossolizadas e a doença progressiva parece ocorrer com frequência relativamente alta em indivíduos com alguma alteração da imunidade mediada por células, seja primária ou adquirida⁴. Condições adquiridas, sabidamente associadas a deficiência da imunidade mediada por células e que parecem predispor à doença criptocócica, são: linfomas, leucemias crônicas, sarcoidose, infecção pelo HIV/AIDS e uso de corticosteróides ou outros agentes imunossupressores em transplantes de órgãos sólidos⁴. Inúmeros estudos, tanto em modelo animal como em humanos, atribuem à imunidade celular papel fundamental na defesa contra esta infecção fúngica⁷⁻¹⁹. A importância do papel dos anticorpos só mais recentemente vem sendo melhor compreendida. Admite-se, hoje, que tanto a imunidade celular quanto a humoral e suas interações desenvolvam papéis fundamentais na defesa do hospedeiro contra infecção por *C. neoformans*. As atividades biológicas atribuídas

aos anticorpos anti-capsulares incluem fixação e ativação do complemento, opsonização, clareamento de antígenos circulantes, potencialização da atividade anticriptocócica de células *natural killer*, dentre outras⁸⁻¹²⁻¹⁴⁻¹⁵.

A hipogamaglobulinemia é alteração da imunidade humoral caracterizada por baixos níveis séricos de anticorpos, sendo encontrada em várias síndromes de imunodeficiência humoral¹⁸. O aspecto clínico mais relevante observado nos pacientes portadores de hipogamaglobulinemia é a suscetibilidade aumentada às infecções. A deficiência na produção de anticorpos, especialmente do tipo IgG, acarreta uma predisposição a infecções recorrentes ou crônicas de vias respiratórias causadas principalmente por bactérias piogênicas capsuladas. Os pacientes podem também desenvolver infecções em outros locais além do trato respiratório e, mais raramente, podem infectar-se com outros patógenos como micoplasmas, micobactérias, vírus, protozoários e fungos²⁻¹⁰⁻¹¹⁻²¹⁻²². O espectro de doenças associadas à hipogamaglobulinemia é ainda mais amplo e não se limita apenas a infecções oportunistas, mas também inclui doenças inflamatórias auto-imunes e neoplasias²⁻³⁻¹¹⁻¹³⁻¹⁸.

As infecções fúngicas associadas a hipogamaglobulinemia são raras, sendo poucos os casos encontrados na literatura. Alguns casos de pneumonia por *Pneumocystis carinii* e de candidíase mucocutânea foram relatados^{2 10 11 22}. Um caso de aspergilose broncopulmonar alérgica, associada a hipogamaglobulinemia, foi descrito²⁰. Encontramos, ainda, um único relato de caso de criptococose associada a hipogamaglobulinemia publicado na literatura⁹.

A ocorrência de doenças oportunistas na hipogamaglobulinemia parece dever-se não somente a anormalidades na imunidade humoral, mas também a alterações na imunidade mediada por células e ao desequilíbrio das interações existentes entre ambas, mediadas por linfocinas^{22 23}. Vários estudos *in vitro* têm demonstrado evidências claras de anormalidades na função de células T de pacientes portadores de hipogamaglobulinemia. Em estudo envolvendo 103 pacientes com hipogamaglobulinemia, cerca de metade apresentava anormalidades de linfócitos-T, representadas por resposta proliferativa subnormal a mitógenos². A constatação de uma maior incidência de doenças auto-imunes e neoplasias reforça a hipótese de que defeitos significativos da imunidade mediada por células contribuem para o amplo espectro de doenças oportunistas infecciosas e não infecciosas observadas nos portadores de hipogamaglobulinemia^{3 13 22}. Haveria, então, uma explicação plausível para a ocorrência de manifestações esperadas e não-esperadas nos pacientes portadores de hipogamaglobulinemia. Infecções bacterianas recorrentes de vias aéreas ocorrem sabidamente devido ao defeito na produção de anticorpos. Por outro lado, neoplasias, doenças auto-imunes e infecções outras (como a infecção por *C. neoformans*), não explicadas pela simples deficiência de anticorpos, ocorrem devido a possíveis anormalidades na imunidade mediada por células²².

Neste trabalho, relatamos dois casos de criptococose em adultos, refratária ao tratamento convencional, nos quais os principais mecanismos de defesa imunológica foram avaliados. Após descartadas as principais condições adquiridas, associadas a maior prevalência de doença criptocócica, realizou-se avaliação simultânea de fagocitose, atividade do complemento, imunidade

humoral e imunidade celular. As dosagens séricas das imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), de ambos os pacientes, revelaram-se subnormais apesar do número normal de linfócitos B (CD19+). A fagocitose por neutrófilos e a atividade do complemento se mostraram normais.

Em relação a imunidade celular, as contagens de linfócitos T e suas subpopulações (CD4+ e CD8+) foram normais. Entretanto, em ambos os pacientes observou-se resposta parcial aos testes cutâneos com antígenos comuns e ausência de resposta ao teste com DNCB, caracterizando alteração funcional ou qualitativa da imunidade celular. O teste com DNCB é de grande importância, pois a resposta ao mesmo não necessita de exposição prévia, acontecendo reação do tipo dermatite de contato em 95% dos indivíduos com imunidade celular preservada¹. A alteração constatada está de acordo com a observação prévia de que defeitos na imunidade mediada por células foram encontrados em até metade dos indivíduos portadores de hipogamaglobulinemia^{2 23}. Estes defeitos também explicariam, em parte, a forma disseminada e agressiva da criptococose nestes pacientes, bem como a refratariedade ao tratamento convencional. A evolução clínica favorável e a elevação dos níveis séricos dos anticorpos foram observadas após reposição de imunoglobulina intravenosa, associada a terapia antifúngica. Aparentemente, pode-se supor que a correção da deficiência de anticorpos levou a uma melhora da função da imunidade mediada por células, denotando uma interação entre ambos os mecanismos de defesa imunológica.

Em suma, os casos aqui apresentados alertam para a possibilidade de a hipogamaglobulinemia ser condição predisponente para infecção por *C. neoformans*, não somente pela deficiência de anticorpos anticapsulares, mas também devido a disfunção da imunidade celular observada nestes pacientes. Estudos controlados, direcionados para avaliação mais detalhada da imunidade em pacientes portadores de hipogamaglobulinemia, podem contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia da infecção por *C. neoformans*. Avaliação dos diversos mecanismos específicos da imunidade, em pacientes acometidos por doença criptocócica, deve ser empregada, visando identificar alterações menos comuns e possibilitando terapia corretiva que auxilie no controle desta infecção.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Dr. Dayr Kiomizu Kazava do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Citopatologia de Ribeirão Preto, SP, pela realização do estudo histopatológico do caso 1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmed AR, Blöse DA. Delayed-type hypersensitivity skin testing. A review. *Archives of Dermatology* 119:934-945, 1983.
2. Cunningham-Rundles C. Clinical and immunological analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 9:22-33, 1989.
3. Cunningham-Rundles C, Siegal FP, Cunningham-Rundles S, Lieberman P. Incidence of cancer in 98 patients with common varied immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 7:294-299, 1987.
4. Diamond RD. *Cryptococcus neoformans*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds) *Principles and practice of infectious diseases*, 5th edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, p. 2707-2718, 2000.
5. Dromer F, Charreire J, Contrepolis A, Carbon C, Yeni P. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. *Infection and Immunity* 55:749-752, 1987.
6. Gordon MA, Casadevall A. Serum therapy for cryptococcal meningitis. *Clinical Infectious Diseases* 21:1477-1479, 1995.
7. Graybill JR, Alford RH. Cell-mediated immunity in cryptococcosis. *Cellular Immunology* 14:12-21, 1974.
8. Griffin Jr FM. Roles of macrophage Fc and C3b receptors in phagocytosis of immunologically coated *Cryptococcus neoformans*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 78:3853-3857, 1981.
9. Gupta S, Ellis M, Cesario T, Ruhling M, Vayuvegula B. Disseminated cryptococcal infection in a patient with hypogammaglobulinemia and normal T cell functions. *The American Journal of Medicine* 82:129-131, 1987.
10. Hermans PE, Diax-Buxo JA, Stobo JD. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency. Clinical observations in 50 patients. *The American Journal of Medicine* 61:221-236, 1976.
11. Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Quarterly Journal of Medicine* 86:31-42, 1993.
12. Houpt DC, Pfrommer GST, Young BJ, Larson TA, Kozel TR. Occurrences, immunoglobulin classes and biological activities of antibodies in normal human serum that are reactive with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Infection and Immunity* 62:2857-2864, 1994.
13. Kinlin LJ, Webster ABD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF. Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinemia. *Lancet* 1:263-266, 1985.
14. Kozel TR, Follette JL. Opsonization of encapsulated *Cryptococcus neoformans* by specific anticapsular antibody. *Infection and Immunity* 31:978-984, 1981.
15. Miller MF, Mitchell TG, Storkus WJ, Dawson JR. Human natural killer cells do not inhibit growth of *Cryptococcus neoformans* in the absence of antibody. *Infection and Immunity* 58:639-645, 1990.
16. Mukherjee J, Zuckier LS, Scharff MD, Casadevall A. Therapeutic efficacy of monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan alone and in combination with amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38:580-587, 1994.
17. Mukherjee S, Lee S, Mukherjee J, Scharff MD, Casadevall A. Monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide modify the course of intravenous infection in mice. *Infection and Immunity* 62:1079-1088, 1994.
18. Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJ. The primary immunodeficiencies. *The New England Journal of Medicine* 333:431-440, 1995.
19. Schimpff SC, Bennett JE. Abnormalities in cell-mediated immunity in patients with *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 55:430-441, 1975.
20. Schwartz HJ, Berger M, Hostoffer R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and common variable hypogammaglobulinemia in an adult male patient: case report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 98:708-710, 1996.
21. Sicherer SH, Winkelstein JA. Primary immunodeficiency diseases in adults. *Journal of American Medical Association* 279:58-61, 1998.
22. Sneller MC, Strober W, Eisenstein E, Jaffe JS, Cunningham-Rundles C. NIH conference. New insights into common variable immunodeficiency. *Annals of Internal Medicine* 118:720-730, 1993.
23. Spickett GP, Webster AD, Farrant J. Cellular abnormalities in common variable immunodeficiency. *Immunodeficiency Reviews* 2:199-219, 1990.