

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação da relação entre a infecção pelo Papilomavírus Humano e outros agentes sexualmente transmissíveis e a expressão de S100A4 em amostras cervicais

**DENISE WOHLMEISTER**

**PORTO ALEGRE, 2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação da relação entre a infecção pelo Papilomavírus Humano e outros agentes sexualmente transmissíveis e a expressão de S100A4 em amostras cervicais

Dissertação apresentada por **Denise Wohlmeister**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

**Orientador:** Prof. Dr. Diogo André Pilger  
**Co-orientadora:** Prof. Dra. Andreia Buffon

PORTO ALEGRE, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 20 de março de 2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Marco Antônio Zonta  
Universidade de Santo Amaro – SP

Prof. Dra. Sandra Leistner Segal  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof. Dr. Vlademir Cantarelli  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

#### CIP - Catalogação na Publicação

Wohlmeister, Denise  
Avaliação da relação entre a infecção pelo Papilomavírus Humano e outros agentes sexualmente transmissíveis e a expressão de S100A4 em amostras cervicais / Denise Wohlmeister. -- 2015.  
168 f.

Orientador: Diogo André Pilger.  
Coorientador: Andréia Buffon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. HPV. 2. Lesões intraepiteliais cervicais. 3. DSTs. 4. S100A4. 5. Candidíase. I. Pilger, Diogo André, orient. II. Buffon, Andréia, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC) do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.



Esta dissertação foi estruturada conforme as recomendações para elaboração de Teses e Dissertações do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/UFRGS), a qual foi organizada no modelo com encarte de publicações, em três capítulos, sendo cada um composto por um artigo científico.





À minha família,  
em especial aos meus pais Nilvo e Sandra e a meu noivo Mathias,  
por todo amor, carinho, incentivo e apoio em minhas escolhas.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Diogo André Pilger pela orientação, dedicação, apoio, disponibilidade e principalmente por confiar neste trabalho e por me ensinar a trabalhar com a pesquisa;

À professora Dra. Andréia Buffon pela força, colaboração e pela motivação em trabalhar com a citologia e a pesquisa;

Ao professor Alexandre M. Fuentefria por todo apoio, pelas colaborações e ensinamentos, correções e sugestões ao longo da minha trajetória;

À professora Luciane N. Calil pelo carinho, amizade, apoio e pela colaboração na realização desta dissertação;

Ao prof. Dr. Marco Antônio Zonta, pelos ensinamentos, disponibilidade, auxílio e amizade;

A Débora, minha companheira de experimentos, pela dedicação, auxílio, disponibilidade, força e apoio;

Aos queridos colegas do LABC – Aline Beckenkamp, Paola, Samuel, Sílvia, Julia, Jéssica, Camilo, Leonardo e Isadora. Agradeço pela força, apoio e amizade e por alegrarem a minha rotina diária no laboratório;

À colega Aline Schuster pela amizade, disponibilidade, força e auxílio;

À Virgínia, pelo apoio e disponibilidade na realização dos experimentos;

Às meninas do Laboratório de Citopatologia de Carazinho, Aline Wagner e Kely Hermes pela amizade, auxílio, força e por todo apoio e disponibilidade prestados;

À Rosana Maria Petry Flôres, pela amizade, força, apoio e, principalmente por me incentivar a amar a área da Citologia;

Ao pessoal do Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá, especialmente à professora Márcia Consolaro e à Fabrícia Gimenes, pelo empenho, hospitalidade e cordialidade em me receber;

À equipe do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, em especial à Maria Lúcia Rossetti e à Regina Bones Barcellos pelo apoio e disponibilidade na realização dos experimentos;

À Flávia, do Laboratório de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela disponibilidade e generosidade na realização das análises;

Aos médicos ginecologistas de Carazinho, Dr. Leandro R. Trentin, Dra. Débora Lorenzi e Dra. Zaira Maria Dhein pela parceria, colaboração e contribuição com a pesquisa;

À enfermeira Daiana Barbosa, do Posto de Saúde do bairro Conceição de Carazinho, pela dedicação e empenho durante a realização da pesquisa;

Ao pessoal do Laboratório de Micologia aplicada, em especial à Gabriela Machado, à Fernanda Klein e à Vanessa Bergamo, pelo apoio e disponibilidade na realização dos experimentos;

À Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela assistência e oportunidade;

Ao CNPq pelo auxílio e oportunidade;

Aos meus amados pais, Nilvo e Sandra agradeço pela educação, apoio, incentivo, compreensão e amor incondicional, por torcerem pela minha felicidade e realização sempre;

Ao meu noivo Mathias pelo incentivo, apoio, força, amor e compreensão. Por estar sempre ao meu lado e entender minha ausência em muitos momentos da nossa vida;

À minha irmã Michele, meu cunhado Jaime e meu querido sobrinho e afilhado Gabriel por todo carinho, força, ajuda e apoio dedicados para chegar até aqui;

Ao meu irmão Renan, minha cunhada Rafaela e meu querido sobrinho e afilhado Miguel, pelo carinho, força e apoio ao longo da minha trajetória;

À querida amiga Mariza Rauber por toda força, carinho e apoio demonstrados.

A toda minha família que sempre me incentivou a lutar em busca da realização dos meus sonhos;

À Deus por estar sempre presente em minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha caminhada.

## RESUMO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é a principal responsável pelo desenvolvimento de lesões intraepiteliais e, potencialmente, do câncer cervical (CC). A presença de fatores como inflamação e outros agentes infecciosos contribuem para a instalação e persistência do vírus. A inclusão da pesquisa do HPV e de outros agentes infecciosos relacionados junto a programas de rastreamento do CC ainda é controversa. Além disso, sabe-se que o processo inflamatório e as lesões celulares decorrentes da presença de HPV e seus cofatores provocam alterações na expressão de diversas proteínas, entre elas a S100A4, que poderia funcionar como biomarcador de exposição. Desta forma, foram analisadas amostras de esfregaços cervicais para investigação da relação do diagnóstico citológico com a presença de agentes infecciosos, além do padrão de expressão da proteína S100A4. Nossos resultados demonstraram que o aparecimento de lesões ou atipias citológicas apresentou associação com a presença de HPV, tanto na infecção simples como na infecção por múltiplos genótipos de alto risco oncogênico, sugerindo a pesquisa molecular do HPV complementar à citologia. A presença de infecção latente pelo HPV também foi observada, a qual deve ser acompanhada com exames citológicos periódicos. A infecção por *Chlamydia trachomatis* desempenha importante papel como cofator para o desenvolvimento do CC e foi prevalente na população estudada, demonstrando associação com a presença de diferentes genótipos de HPV. Tanto nas pacientes sintomáticas como nas assintomáticas houve a detecção de leveduras do gênero *Candida*, sendo que a mais prevalente foi a *C. albicans* apresentando-se sensível à Anidulafungina e Anfotericina B, na maioria dos casos, e resistente ao Fluconazol. Com relação à expressão da proteína S100A4, houve associação com as alterações citológicas características do HPV, nas quais houve redução de sua expressão à medida que aumentou o grau da lesão. No entanto, também observamos que há expressão fisiológica da proteína S100A4 no epitélio escamoso estratificado da ectocérvice que varia de acordo com o grau de maturação celular e a presença de alterações citológicas inflamatórias, onde foi demonstrado aumento da sua expressão. Portanto, a avaliação da expressão da proteína S100A4 pode auxiliar no diagnóstico precoce do câncer de colo do útero nas lesões intraepiteliais cervicais positivas para HPV. Analisando-se globalmente, estes resultados sugerem a inclusão da pesquisa molecular de HPV e *C. trachomatis*, bem como a identificação de leveduras do gênero *Candida* complementares à citologia esfregativa junto a programas de rastreamento. Além disso, a proteína S100A4, mostrou-se promissora como biomarcador dos efeitos celulares dos fatores associados. Observa-se que a associação de diferentes metodologias permite a detecção precoce de lesões e, conseqüentemente, contribuem para a redução da incidência do CC.

**Palavras-chave:** HPV, lesões intraepiteliais cervicais, DSTs, S100A4.



## ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) infection is the main responsible for the development of intraepithelial lesions and potentially cervical cancer (CC). The presence of factors such as inflammation and other infectious agents contribute to the onset and persistence of the virus. The inclusion of HPV research and other infectious agents associated in the CC screening programs is still controversial. In addition, it is known that inflammation and cell injury caused by the presence of HPV and their cofactors cause changes in gene expression and function of several proteins, including the S100A4 which could function as a biomarker of exposure. Thereby, samples of cervical specimens were analyzed to investigate the relationship of cytological diagnosis in the presence of infectious agents, other than the standard expression of S100A4 protein. Our results demonstrated that the development of lesions or cytological atypia was associated with the presence of HPV in either simple infection or infection by multiple genotypes of high oncogenic risk, indicating the importance of molecular HPV analysis complementary to cytology. The presence of latent infection was also observed and must be monitored with periodic cytological examinations. The *Chlamydia trachomatis* infection plays an important role as a cofactor for the development of CC and was prevalent in the population studied, demonstrating association with the presence of different HPV genotypes. For both symptomatic and asymptomatic patients there was a yeast detection of *Candida*, and the most prevalent was the *Candida albicans* presenting sensitive to Anidulafungin and Amphotericin B, in most cases, and resistant Fluconazole. Regarding the S100A4 protein expression, there was association with abnormal cytological HPV characteristics where a reduction of expression could be observed and the degree of injury increased. However, we also observed that there are physiological expression of S100A4 protein in the stratified squamous epithelium of the ectocervix and this varies according to the degree of cell maturation and the presence of inflammatory cell alterations, increased expression where demonstrated. Therefore, the evaluation of the expression of S100A4 protein may assist in the early diagnosis of cervical cancer in cervical intraepithelial lesions positive for HPV. Overall, these results suggest the inclusion of molecular research of HPV and *C. trachomatis*, and the identification of yeasts *Candida* complementary to exfoliative cytology in screening programs. In addition, the S100A4 protein has shown to be promising as a biomarker for cellular effects of associated factors. It was observed that the association of different methodologies allows early detection of lesions and therefore contribute to reducing the incidence of CC.

**Keywords:** HPV, Cervical Intraepithelial Lesions, STDs, S100A4.





## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Organização genômica do HPV 16.....27

**Figura 2.** Representação da infecção pelo HPV no epitélio escamoso estratificado da ectocérvice e do desenvolvimento das lesões precursoras ao câncer cervical escamoso.....29

**Figura 3.** Representação de amostras citológicas coradas pela técnica de Papanicolaou e classificadas de acordo com o Sistema de Bethesda de 2001.....31



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGUS - Células Glandulares Atípicas

ASCH - Células atípicas quando não se pode excluir lesão de alto grau

ASCUS - Células escamosas atípicas de significado indeterminado

CC - Câncer Cervical

DIP - Doença Inflamatória Pélvica

DLN - Dentro dos Limites da Normalidade

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DSTs - Doenças Sexualmente Transmissíveis

E - Região Precoce (*Early*)

HPV - Papilomavírus Humano

HR - *High-Risk*

HSIL - Lesão Intraepitelial de Alto Grau

HSV - *Herpes simplex virus*

L - Região Tardia (*Late*)

LCR - Região Regulatória (*Long Control Region*)

LR - *Low-Risk*

LSIL - Lesão Intraepitelial de Baixo Grau

NLIM - Negativo para Lesão Intraepitelial ou Malignidade

p53 - Proteína p53

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pRB - Proteína do Retinoblastoma

RI - Reativo e/ou Inflamatório

RNA - Ácido Ribonucleico



## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	21
I.1 CÂNCER CERVICAL E HPV .....	25
I.2 OUTROS AGENTES CAUSADORES DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS RELACIONADOS AO CÂNCER CERVICAL .....	32
I.2.1 <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	33
I.2.2 Herpes simplex virus .....	34
I.2.3 <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	35
I.2.4 <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	36
I.2.5 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	37
I.2.6 <i>Treponema pallidum</i> .....	37
I.3 LEVEDUROSES CÉRVICO-VAGINAIS.....	38
I.4 PROTEÍNA S100A4 .....	40
II. OBJETIVOS .....	43
III. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	47
III.1 CAPÍTULO 1: Association of HPV and <i>Chlamydia trachomatis</i> with intraepithelial lesions in cervix samples.....	49
III.2 CAPÍTULO 2: ASSOCIAÇÃO DA CITOLOGIA CÉRVICO-VAGINAL E DA CULTURA MICOLÓGICA AUMENTAM A DETECÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> SP. EM MULHERES SINTOMÁTICAS .....	85
III.3 CAPÍTULO 3: S100A4 PROTEIN PHYSIOLOGICALLY EXPRESSED IN SQUAMOUS EPITHELIUM AND REDUCED IN PRECURSOR LESIONS OF CERVICAL CANCER.....	101
IV. DISCUSSÃO GERAL.....	121
V. CONCLUSÕES GERAIS .....	137
VI. PERSPECTIVAS .....	141
VII. REFERÊNCIAS .....	145
VIII. ANEXOS.....	161
VIII.1 PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFRGS.. .....	163
VIII.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – MAIOR DE IDADE..	165
VIII.3 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – MENOR DE IDADE.	166
VIII.4 TERMO DE ASSENTIMENTO – RESPONSÁVEL MENOR DE IDADE.....	167
VIII.5 Questionário elaborado especificamente para a pesquisa.....	168



## I. Introdução

---





A citologia cérvico-vaginal está relacionada à detecção de lesões intraepiteliais e aos processos infecciosos envolvidos, apresentando estrita relação com a prevenção do câncer cervical (CC). É de grande importância para a saúde pública, sendo imprescindível na identificação de lesões que, quando não tratadas, desenvolvem a neoplasia uterina. O câncer de colo do útero ainda acomete um grande número de mulheres. No entanto, é um dos poucos tipos de neoplasias que podem ser evitados por meio da realização de exames periódicos preventivos, principalmente por apresentar como principal característica a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), o qual provoca alterações no epitélio classificadas como lesões intraepiteliais de baixo e alto grau. A detecção precoce das lesões, bem como outros fatores envolvidos contribui para redução dos casos de CC, pois seu prognóstico está relacionado ao estágio em que a doença se encontra quando diagnosticada (Hartmann *et al.*, 2002; Organization, 2013).

A simples infecção pelo HPV não é suficiente para o desenvolvimento da neoplasia. Outros fatores podem estar relacionados, como socioambientais ou exógenos, incluindo contraceptivos hormonais, fumo, paridade e coinfeção com outros agentes transmitidos sexualmente, e condição socioeconômica; fatores virais, como infecção por tipos específicos do vírus, coinfeção com outros tipos de HPV, HPV variantes, carga viral e integração viral; fatores do hospedeiro, como hormônios endógenos, fatores genéticos e outros relacionados à resposta imune; coinfeção com outros agentes infecciosos (Rodrigues *et al.*, 2009).

De acordo com relatos da literatura, a incidência de HPV é maior em mulheres com outras infecções genitais, sendo que a flora microbiana vaginal pode ser considerada cofator na patogênese do CC. Lesões induzidas pelo HPV podem estar associadas com infecções vaginais, entre elas a infecção por *Candida* sp, encontrada em cerca de 25% das mulheres com infecção por HPV (Murta *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2008). Outros microrganismos que podem contribuir para a infecção pelo HPV são os agentes etiológicos de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), como *Chlamydia trachomatis*, Herpes vírus simples 1 e 2, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonas vaginalis* e *Treponema pallidum*, entre outros. Dados recentes demonstram a associação entre

estes agentes e a patogênese do CC, os quais podem causar microtraumas no epitélio e contribuir para a infecção e persistência do HPV (Muvunyi *et al.*, 2011; Gimenes *et al.*, 2014).

A visualização dos microrganismos presentes ou as alterações celulares por eles causadas são frequentes nos esfregaços citológicos corados pela metodologia de Papanicolaou, demonstrando ser um exame de extrema relevância no reconhecimento de lesões inflamatórias do trato genital feminino, porém, nem sempre permitindo determinar o agente causal e restringindo desta forma sua sensibilidade (Koss, 2006; Martins *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2009). Alguns processos infecciosos requerem técnicas mais específicas de isolamento e identificação que, quando associados à citologia convencional, possibilitam um diagnóstico mais sensível e preciso. Novas metodologias estão sendo desenvolvidas e empregadas de forma promissora, especialmente as moleculares, na identificação mais específica dos microrganismos possivelmente envolvidos na carcinogênese cervical, em complemento à citologia convencional.

A presença de inflamação, muitas vezes ocasionada por agentes etiológicos das DSTs, além de ocultar alterações citológicas pré-malignas ou malignas (Og *et al.*, 2010), facilita a infecção e persistência do HPV no epitélio e conseqüentemente contribui para a carcinogênese. As células infectadas pelo HPV sofrem mudanças na sua função e expressão gênica, com alteração na expressão de diversas proteínas, entre elas a S100A4, intimamente relacionada a processos inflamatórios. Esta proteína pertence a uma família de proteínas que desempenham funções intra e/ou extra celulares, as quais são responsáveis, entre outros, pela regulação da proliferação celular, inflamação, migração, metástase e invasão tecidual (Donato *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Os dados existentes na literatura ainda são controversos e escassos com relação à expressão da proteína S100A4 em lesões precursoras e seu papel como possível biomarcador de CC. Para tanto, torna-se relevante um melhor entendimento a respeito da possível associação entre processos inflamatórios e infecciosos, presença de HPV e expressão de S100A4, visto que, a investigação de novos biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos é

importante ferramenta para avaliação da predisposição à carcinogênese, reduzindo a incidência de CC.

Diante deste cenário, percebe-se que cada vez mais são necessários meios eficazes de controle e identificação de fatores que de alguma forma possam contribuir para a progressão tumoral, principalmente pelo fato do CC ser considerado de fácil prevenção, quando suas lesões precursoras são detectadas. Para tanto, existe a necessidade de investigar a relação entre o diagnóstico citológico, com a presença de diferentes agentes infecciosos, em especial o HPV, e a expressão da proteína S100A4 em esfregaços cervicais, visando um melhor prognóstico e acompanhamento das pacientes que apresentarem alteração em algum destes parâmetros. Dessa forma, a partir de amostras clínicas, o presente trabalho realizou a análise citológica, a detecção molecular do HPV e seus diferentes genótipos, bem como de agentes etiológicos de DSTs além do padrão de expressão da proteína S100A4 em esfregaços de epitélio normal e com lesões precursoras.

### **I.1 Câncer Cervical e HPV**

O câncer cervical é uma neoplasia que se desenvolve a partir de lesões intraepiteliais que ocorrem no colo do útero e é considerada a terceira mais frequente no mundo, com estimativa maior que 15.500 novos casos no ano de 2014, entre as mulheres brasileiras, sendo até duas vezes mais prevalente nos países subdesenvolvidos (Inca, 2014). Embora nos últimos 30 anos as taxas de mortalidade tenham diminuído, cerca de 18.430 novos casos são diagnosticados no país, com cerca de 4.800 vítimas ao ano (Laudadio, 2013; Organization, 2013; Wang *et al.*, 2013).

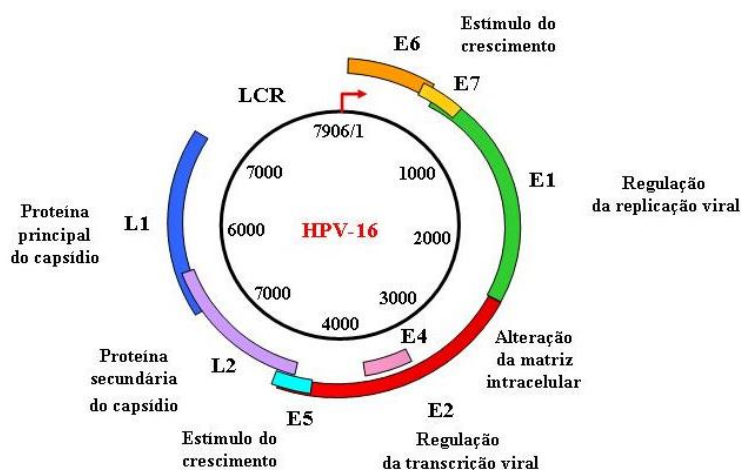
O HPV é o vírus sexualmente transmissível mais comum atualmente, sendo considerado o principal agente etiológico do CC. Sua infecção é necessária, mas não suficiente para a progressão tumoral. Outros fatores como o início precoce da atividade sexual, número elevado de gestações ao longo da vida e a presença de outras DSTs estão envolvidos, contribuindo para a persistência do vírus e a carcinogênese cervical (Al-Daraji e Smith, 2009; Schiffman e Solomon, 2013). A

transformação das células do epitélio cervical ocasionadas pelo HPV provoca lesões pré-cancerosas que, se não detectadas precocemente, podem evoluir para o câncer propriamente dito (Irion e Buffon, 2009; Hyacinth *et al.*, 2012; Uyar e Rader, 2014).

A infecção pelo vírus do HPV ocorre no epitélio escamoso do trato cervical, anal e perianal, porém seu contágio também pode ocorrer por meio de fômites contaminados (Do Carmo e Fiorini, 2007; Bringhenti, 2010). O HPV é membro da família *papillomaviridae* e possui uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) circular, contendo aproximadamente 7.900 pares de base. O DNA do vírus penetra nas células basais do epitélio através de lesões existentes na mucosa escamosa e, uma vez presente, provoca alterações celulares proliferativas as quais, na maioria das vezes, são observadas no exame de citologia esfoliativa (Do Carmo e Fiorini, 2007; Hellner *et al.*, 2009; Bringhenti, 2010; Abreu *et al.*, 2012; Laudadio, 2013).

O genoma do HPV possui uma organização geral comum aos diferentes tipos virais (Figura 1), sendo constituído por uma região regulatória (*Long Control Region* ou LCR), uma região precoce (*Early* ou E) e uma região tardia (*Late* ou L). A LCR influencia na transcrição, replicação e tropismo tecidual. A porção codificante do genoma inclui os genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e dois genes tardios (L1 e L2). E1 e E2 estão envolvidos com transcrição e replicação. E6 e E7 direcionam a gênese tumoral, interferindo na função normal dos genes supressores de tumor do hospedeiro, p53 e pRB, respectivamente (Consolaro, 2012).

A integração do HPV de alto risco no genoma do hospedeiro é considerada um marcador de progressão maligna, pois altera seu ciclo celular, levando à persistência da infecção e ao desequilíbrio na regulação da expressão das oncoproteínas E6 e E7, as quais são necessárias para a indução e a manutenção do fenótipo transformado. A proteína E6 do HPV atua sobre a proteína supressora de tumor p53, contribuindo para a proliferação tumoral. A proteína E7 do HPV de alto risco induz a degradação da proteína do retinoblastoma (pRB), consequentemente prejudicando a apoptose, o ciclo celular e a resposta ao dano no DNA. Assim sendo, a perda da função das proteínas p53 e pRB, induzida pelas oncoproteínas virais está estritamente relacionada com a persistência do vírus e a manutenção tumoral (Hellner *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2010).



(Consolaro, 2012)

**Figura 1.** Organização genômica do HPV 16. Região precoce (*Early*), região tardia (*Late*) e região regulatória (*Long Control Region*).

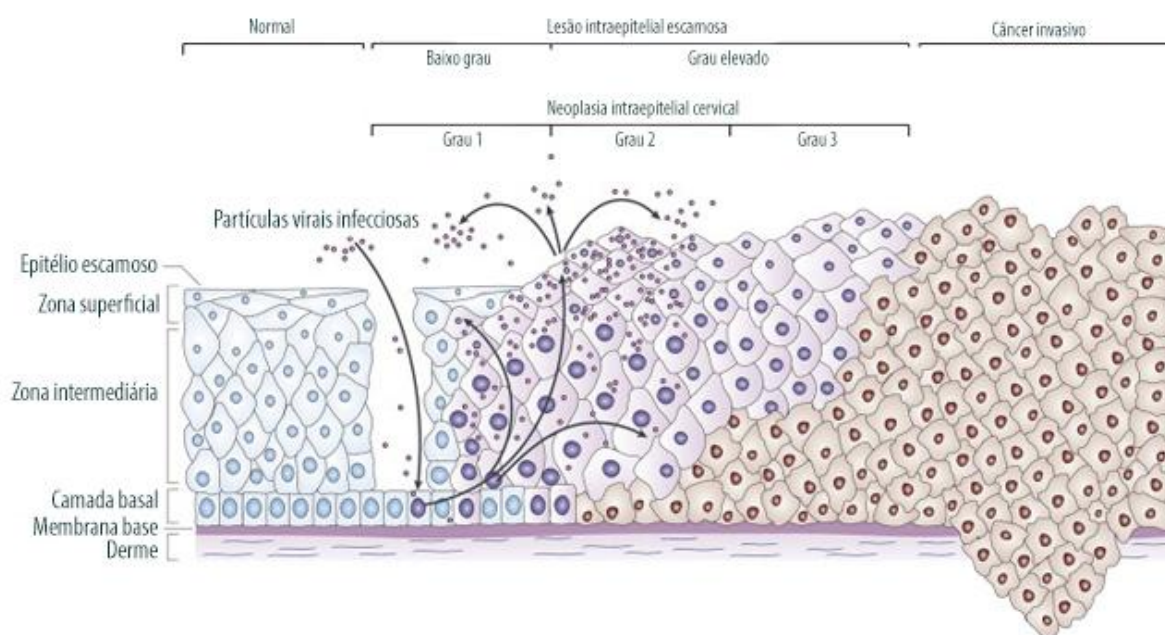
Existem cerca de 200 genótipos diferentes de HPV, os quais apresentam variações genéticas e na sua capacidade oncogênica. Destes, aproximadamente 40 estão associados a infecções do epitélio escamoso do trato cervical e são classificados em grupos de alto e baixo risco, de acordo com seu relativo potencial de causar lesões malignas (Al-Daraji e Smith, 2009; Hellner *et al.*, 2009; Abreu *et al.*, 2012). Desta maneira, os genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, são classificados como alto risco (*High-Risk* - HR). Os demais genótipos são classificados como baixo risco oncogênico (Schiffman *et al.*, 2011).

Enquanto que os HPVs de baixo risco causam apenas lesões benignas, como verrugas genitais, os HPVs de alto risco oncogênico causam lesões intraepiteliais pré-malignas que poderão evoluir para o CC. Em aproximadamente todos os casos de câncer de colo de útero têm sido encontrados genótipos de HPV-HR, com proporções decrescentes entre lesões de alto risco e baixo risco, respectivamente (Stevens *et al.*, 2007; Hellner *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2012). A infecção por diferentes tipos de HPV está estritamente relacionada à região geográfica da população estudada. No Brasil, estudos demonstram uma prevalência entre 24 e 35% de infecção por HPV, sendo que os genótipos encontrados com maior

frequência são do HPV 16, 18, 31, 52 e 58 (De Sanjosé *et al.*, 2007; Coser *et al.*, 2013).

Em muitos casos, a infecção pelo HPV pode ser assintomática, transitória e autorresolutiva, sendo que em 80% dos casos pode ocorrer regressão espontânea, sendo eliminado pelo sistema imunológico do hospedeiro sem conduzir anormalidades celulares. No entanto, em aproximadamente 20% das mulheres, a infecção pelo HPV pode ser persistente, podendo evoluir para CC em até 10% dos casos (Bringhenti, 2010). A infecção pelo HPV pode ocorrer de forma clínica, subclínica ou ainda de forma latente, caracterizando-se, respectivamente, pela presença de lesões verrucosas, alterações citológicas, colposcópicas ou histopatológicas e identificação molecular sem alterações morfológicas (Do Carmo e Fiorini, 2007; Abreu *et al.*, 2012).

A infecção pelo HPV ocorre através de microabrasões ou microtraumas no epitélio cervical, o qual é constituído pela ectocérvice, endocérvice e zona de transformação. A ectocérvice é composta por epitélio escamoso estratificado e a endocérvice composta por epitélio colunar. Na zona de transformação são encontradas células metaplásicas, totipotentes que estão em constante replicação. O vírus pode infectar tanto as células imaturas do epitélio escamoso estratificado quanto as células da zona de transformação, as quais são mais suscetíveis à infecção e à integração viral, podendo desenvolver lesões precursoras que poderão evoluir para o CC (Rodríguez-Cerdeira *et al.*, 2012; Wheeler, 2013), conforme ilustrado na Figura 2.



Adaptado de Woodman *et al.* (2007)

**Figura 2.** Representação da infecção pelo HPV no epitélio escamoso estratificado da ectocérvice e o desenvolvimento das lesões precursoras ao câncer cervical. Microabrasões permitem o acesso das partículas virais à camada basal do epitélio, onde se encontram as células imaturas de reserva. Estas células estão em constante replicação, o que facilita a integração, proliferação e multiplicação viral. As células infectadas sofrem alterações que são classificadas em diferentes graus de lesão intraepitelial, de acordo com o nível de acometimento do epitélio. Com o passar do tempo, se não tratadas, as células das lesões precursoras infectadas com HPV invadem a membrana basal e atingem o estroma, caracterizando o carcinoma escamoso invasivo.

A frequência de infecção pelo HPV diminui consideravelmente ao longo da idade da mulher, sendo mais prevalente em mulheres jovens, quando as células cervicais estão em constante replicação e o microambiente cervical está mais propenso à infecção viral. A faixa etária na qual normalmente o CC começa a se desenvolver é entre 20 e 29 anos, porém, isso ocorre de forma relativamente lenta, aumentando seu risco consideravelmente, até atingir o pico etário entre 50 e 60 anos (Murta *et al.*, 2001; Inca, 2014).

A realização anual do exame de citologia esfoliativa, conhecido como Papanicolaou, é de suma importância para prevenir a carcinogênese, principalmente pelo fato da progressão lenta das lesões precursoras até o câncer invasivo,

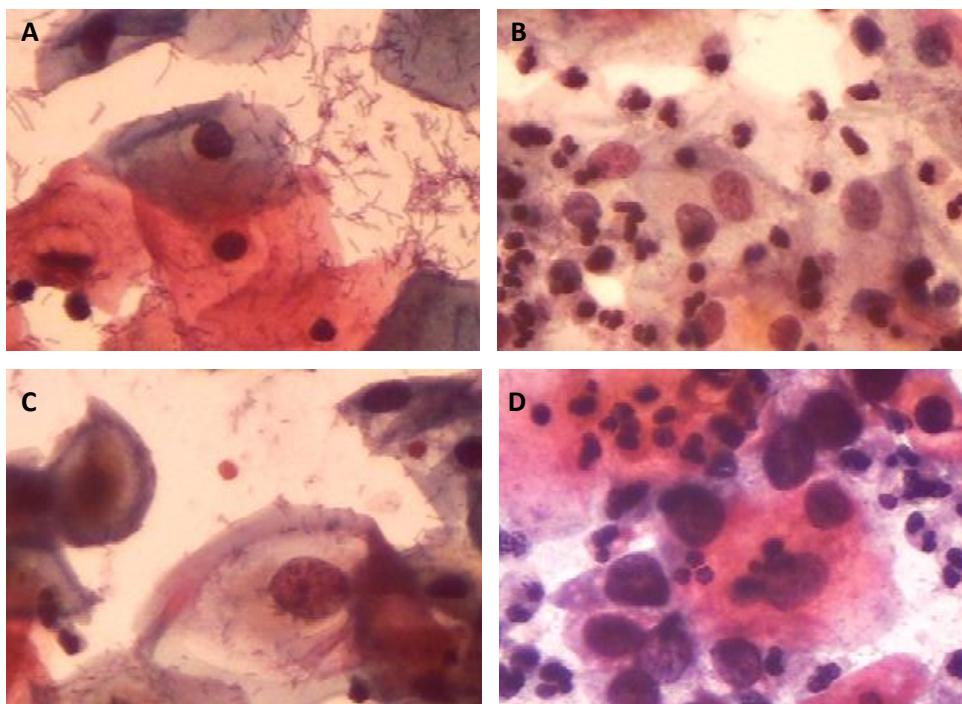
permitindo que estas sejam identificadas ainda em fase inicial (Corrêa *et al.*, 2009; Ferlay *et al.*, 2010; Schiffman e Solomon, 2013; Tornesello *et al.*, 2013). Considerado simples, eficaz, reprodutível e com baixo custo, este exame possibilita o diagnóstico precoce e tratamento adequado, prevenindo o carcinoma uterino (Martins *et al.*, 2007; Irion e Buffon, 2009; Engler, 2012).

O teste de Papanicolaou é uma das metodologias mais utilizadas na prevenção do câncer de colo do útero e, seu emprego apresenta redução de até 70% na incidência e prevalência de CC nos países desenvolvidos. Tem como base a identificação das lesões precursoras nos esfregaços cérvico-vaginais, as quais abrangem desde anormalidades não invasivas cervicais do epitélio escamoso, que variam entre alterações celulares associadas a uma infecção transitória do HPV até alterações celulares precursoras de alto risco para um câncer invasivo (Ciapponi *et al.*, 2011; Engler, 2012; Hyacinth *et al.*, 2012). É considerado um método com sensibilidade relativa, quando realizado por profissional devidamente especializado e treinado, voltado para identificação das alterações celulares, apesar disso, o teste ainda apresenta limitações, que podem ocorrer desde a fase pré-analítica até a fase analítica. É necessário que a coleta seja representativa dos diferentes tipos celulares do epitélio e que a confecção e a fixação do esfregaço na lâmina sejam adequadas para que a análise possa ser realizada satisfatoriamente. Também pode ocorrer variação na interpretação interobservador, que torna o diagnóstico relativamente subjetivo e sua sensibilidade pode ser prejudicada na infecção latente pelo HPV, ou seja, o vírus pode estar presente sem ocasionar alterações citológicas passíveis de visualização microscópica, e na detecção de agentes etiológicos de DSTs, os quais podem contribuir para a infecção viral e conseqüentemente para a carcinogênese.

O Sistema Bethesda de 2001 classifica o diagnóstico citológico do epitélio escamoso, presente na ectocérvice (Figura 3) em: 1) Negativo para Lesão Intraepitelial ou Malignidade (NLIM), o qual inclui amostras Dentro dos Limites da Normalidade e também aquelas com alterações inflamatórias benignas reativas; 2) Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASCUS); 3) Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (LSIL); 4) Células atípicas quando não se pode excluir lesão de alto grau (ASCH); 5) Lesão Intraepitelial de Alto Grau (HSIL); 6) Carcinoma



Escamoso. Referente ao epitélio glandular, da endocérvice, preconiza-se a classificação em: 1) Células Glandulares Atípicas (AGUS); 2) Adenocarcinoma in situ; 3) Adenocarcinoma (Solomon, 2005; Engler, 2012).



**Figura 3.** Representação de amostras citológicas coradas pela técnica de Papanicolaou e classificadas de acordo com o Sistema de Bethesda de 2001 em: (A) Negativa para lesão intraepitelial ou malignidade, dentro dos limites da normalidade; (B) Negativa para lesão intraepitelial ou malignidade com alterações inflamatórias benignas reativas; (C) Lesão intraepitelial de baixo grau, presença de célula escamosa com marginalização citoplasmática, característica dos efeitos citopáticos do HPV; (D) Lesão intraepitelial de alto grau (imagens obtidas junto ao acervo do autor).

Células escamosas maduras, com discariose nuclear leve e citoplasma abundante e bem delimitado são sinais patognomônicos de uma LSIL. A presença de coilocitose também pode ser observada, onde as células apresentam contorno nuclear levemente irregular e cavitação citoplasmática perinuclear, deslocando parte do citoplasma para a periferia e, o citoplasma torna-se denso e queratinizado (Solomon, 2005; Munhoz, 2012). A HSIL é caracterizada pela presença de discariose moderada a severa em células imaturas, dispostas nas camadas mais profundas do epitélio escamoso. O núcleo apresenta-se hipercoreado, com cromatina

granular e membrana nuclear com deformidades e pleomorfismo. As células podem ser encontradas de forma isolada ou agrupada, formando fileiras e sincícios. As células de ASCUS e ASCH geralmente apresentam modificações na morfologia celular, incapazes de determinar com segurança o tipo de lesão envolvida (Araújo, 2012; Munhoz, 2012).

O carcinoma escamoso é seguramente diagnosticado devido às alterações morfológicas típicas evidentes, com formas bizarras, núcleos desorganizados, anisocitose, núcleos hipercoreados, com membrana nuclear irregular, podendo-se observar macronúcleolos, acompanhados de diátese tumoral e/ou hemorrágica. As células de adenocarcinoma apresentam anisocariose, com núcleos irregulares, alongados, cromatina densa e membrana nuclear irregular. Podem ser observados macronúcleolos (Araújo, 2012; Zonta, 2012).

Quando o CC invasivo é diagnosticado, a conduta de tratamento envolve a avaliação da extensão e do tamanho do tumor, da intensidade de invasão, do espaço microvascular da invasão tumoral, do comprometimento dos linfonodos próximos e do grau de diferenciação do tumor. Assim, poderão ser empregadas normalmente cirurgia e radioterapia. De acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), o tratamento do CC é determinado pela avaliação clínica do estadiamento determinado na biópsia após conização; para estágios iniciais recomenda-se cirurgia ou radioterapia, enquanto que para casos mais avançados, a quimioterapia também é indicada (Amaro-Filho *et al.*, 2013; Inca, 2014).

## **I.2 Outros agentes causadores de doenças sexualmente transmissíveis relacionados ao câncer cervical**

A citologia esfoliativa foi originalmente desenvolvida e é utilizada na rotina como teste de triagem para detectar alterações cervicais e lesões precursoras do câncer de colo do útero. Posteriormente, também acabou desempenhando importante papel no diagnóstico de infecções do trato genital feminino, detectando a presença de alterações morfológicas causadas por alguns vírus, bactérias e fungos que infectam o trato genital feminino (Og *et al.*, 2010; Kashyap e Bhambhani, 2011).

Por meio da citologia é possível, classicamente, identificar alterações celulares ocasionadas por alguns microrganismos como Herpes vírus, *Chlamydia trachomatis*, e *Trichomonas vaginalis*. No entanto, existem algumas limitações com relação à identificação e à confirmação destes e de outros microrganismos presentes (Koss, 2006; Martins *et al.*, 2007). Em complementaridade à citologia convencional e com o intuito de aumentar o valor preditivo positivo, diferentes técnicas vêm sendo empregadas de forma promissora na detecção de microrganismos capazes de ocasionar DSTs, as quais, se não tratadas adequadamente contribuem para a carcinogênese cervical.

### **1.2.1 *Chlamydia trachomatis***

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, considerada uma das principais causas de DSTs, ocorrendo cerca de 89 milhões de novos casos anualmente no mundo (Cornetta *et al.*, 2006; Deluca *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2012). Citologicamente, a presença de inclusões citoplasmáticas em material endocervical ou uretral, com pequenos elementos dentro de um único vacúolo citoplasmático nas células endocervicais ou metaplásicas é sugestivo de infecção por *C. trachomatis*. Múltiplos vacúolos com inclusão eosinofílica, com infiltrado inflamatório também podem ser observados e as células infectadas apresentam características inflamatórias como aumento nuclear, multinucleação e hiperchromasia (Siqueira, 2012).

A detecção de *Chlamydia trachomatis* muitas vezes não está acessível para a maioria da população, sendo normalmente utilizado somente o diagnóstico indireto, através da pesquisa de anticorpos específicos e a citologia pela coloração de Papanicolaou, os quais apresentam baixa sensibilidade com relação a este patógeno. Outros testes laboratoriais estão disponíveis, entre os quais destacam-se a imunofluorescência enzimática, a cultura de células, o imunoensaio direto, a captura híbrida e a reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo este último, considerado o mais sensível (Cornetta *et al.*, 2006), no entanto, ainda possuem valores elevados. É importante ressaltar que a ampliação do uso dessas

metodologias poderia reduzir o custo, conduzindo a um aumento dos intervalos de rastreio (Nomelini *et al.*, 2012).

As infecções genitais relacionadas a este patógeno normalmente são assintomáticas ou então apresentam sinais leves e sintomas inespecíficos, sendo muito importante sua detecção precoce. Quando não tratadas, estas infecções podem ocasionar inúmeras complicações como a doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade, gravidez ectópica, infecções perinatais (Deluca *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2012). Devido principalmente a sua natureza assintomática, a ausência de tratamento torna a infecção por *Chlamydia trachomatis* persistente, favorecendo sua capacidade de induzir metaplasia e inflamação crônica, o que a torna um fator potencial relacionado ao alto risco de infecção pelo HPV. Assim sendo, a *Chlamydia trachomatis* desempenha um papel de facilitador da infecção pelo HPV no epitélio do colo uterino, permitindo a entrada e inoculação do vírus, tornando-se conseqüentemente um cofator para o desenvolvimento de lesões precursoras do CC (Urbina *et al.*, 2010; Deluca *et al.*, 2011).

Existem evidências sugerindo que, como grande parte das infecções causadas pelo HPV são transitórias, a presença da *Chlamydia trachomatis* desempenha importante função atuando como cofator, promovendo a persistência do vírus ou aumentando sua oncogenicidade e contribuindo para a evolução das lesões cervicais (Deluca *et al.*, 2011). Ainda, outros trabalhos ressaltam que a associação entre estes dois agentes pode estar relacionada à potencialização mútua da infecção, onde a presença das células inflamatórias facilita a penetração viral, sendo cada vez mais necessários estudos para estabelecer se esta coinfeção contribui para o aumento do risco do desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais (Urbina *et al.*, 2010).

### **1.2.2 Herpes simplex vírus**

O *Herpes simplex vírus* (HSV) ou  $\alpha$ -herpesvirus é um vírus de DNA, subdividido em duas classes, HSV1 e HSV2. O HSV2 acomete mais a região genital, e é transmitido por via sexual ou urogenital, podendo infectar células escamosas imaturas, metaplásicas e endocervicais. No entanto, devido principalmente às

mudanças nas práticas sexuais, o HSV1, geralmente encontrado na região facial, também é encontrado em infecções do trato genital feminino e masculino (Al-Daraji e Smith, 2009; Siqueira, 2012). Os efeitos citopáticos do HSV constituem em citomegalia e cariomegalia, deslocamento da cromatina para a periferia, células gigantes multinucleadas com amoldamento nuclear. O padrão cromatínico é perdido, tornando aspecto nebuloso, também conhecido como “vidro fosco”, opaco, com marginalização da cromatina. Também são observados inclusões intranucleares eosinofílicas redondas ou ovais (Solomon, 2005; Siqueira, 2012).

Assim como ocorre com a *Chlamydia trachomatis*, a infecção por HSV pode estar associada ao HPV e à carcinogênese cervical. Alguns estudos relatam que as lesões herpéticas ulcerativas ocasionadas no epitélio contribuem para a infecção e persistência do HPV e conseqüentemente evolução tumoral. Também descrevem que há uma interação do HSV com o HPV que contribuem na inativação da proteína supressora de tumor p53 e que a infecção por HSV provoca danos no DNA do hospedeiro, acelerando a replicação e integração do DNA do HPV (Al-Daraji e Smith, 2009).

### **1.2.3 *Trichomonas vaginalis***

O *Trichomonas vaginalis* é um eucarioto, protozoário exclusivamente humano, anaeróbio facultativo, flagelado, unicelular, provido de grande mobilidade. Sua infecção é limitada ao epitélio escamoso e é considerado a DST não viral mais comum no mundo todo, sendo um marcador de risco para outras DSTs. Acredita-se que cerca de 170 milhões de pessoas são infectadas anualmente e a transmissão deste agente ocorre através do ato sexual, secreções, roupas íntimas, toalhas úmidas ou objetos contaminados. Nos homens a infecção geralmente é assintomática, mas pode desenvolver uretrite pruriginosa; nas mulheres pode ocorrer corrimento vaginal abundante, purulento, amarelo acastanhado, esverdeado ou esbranquiçado, fétido, bolhoso e pruriginoso, acompanhado de dispereunia e ocasionalmente, disúria (Powell *et al.*, 2006; Shen-Gunther e Yu, 2011; Siqueira, 2012).

Na citologia ocorrem diversas alterações sugestivas da presença de *T.vaginalis*, como redução da flora de lactobacilos e aumento da flora mista ou cocóide, apagamento de bordas citoplasmáticas, halos perinucleares, anfofilia, pseudoeosinofilia, leucocitose, cromatina grosseira, hipercromasia, binucleação, cariomegalia, citoplasma cianofílico. O formato piriforme, com núcleo pálido e excêntrico, oval, próximo aos flagelos, possibilita sua identificação nos esfregaços citológicos. Pode ainda ocorrer presença de grânulos citoplasmáticos eosinofílicos, em meio a um fundo do esfregaço sujo (Siqueira, 2012). Existem diferentes métodos utilizados no diagnóstico da tricomoníase, entre eles, microscopia a fresco, cultura, PCR e aglutinação em látex (Powell *et al.*, 2006).

#### **1.2.4 *Mycoplasma genitalium***

O *Mycoplasma genitalium* é uma pequena bactéria que foi isolada pela primeira vez a partir de homens com uretrite não gonocócica, sendo um importante agente nesta infecção, tanto na forma persistente, como recorrente. Embora seja um patógeno emergente, sua infecção ainda é subestimada em muitos países (Zheng *et al.*, 2014). Estudos sugerem que o *Mycoplasma genitalium* é um dos responsáveis pela DIP e há evidências de que possa ser considerado um agente etiológico de DSTs, endometrites, uretrites masculina e feminina, e fator de infertilidade tubária em associação com cervicites (Shinobu *et al.*, 2007). Também está associado a complicações durante a gestação e parto prematuro, bem como infecções extra-genitais (Daley *et al.*, 2014). O *M. genitalium* é considerado um agente sexualmente transmissível e acredita-se que esta infecção ocorra principalmente através da contaminação dos espermatozoides, sendo transportado para o trato genital feminino (Koss, 2006; Daley *et al.*, 2014).

A infecção por *M. genitalium* está presente em diversas patologias ginecológicas e a sua detecção não é comum na rotina laboratorial (Svenstrup *et al.*, 2014). Técnicas de biologia molecular como PCR convencional ou PCR em tempo real têm aumentado, consideravelmente, a sensibilidade na detecção deste agente quando comparado à metodologia de cultura, a qual já foi muito utilizada no diagnóstico laboratorial (Daley *et al.*, 2014; Gomih-Alakija *et al.*, 2014).

### **1.2.5 *Neisseria gonorrhoeae***

A *Neisseria gonorrhoeae* é o agente etiológico da gonorreia, que é uma DST que acomete homens e mulheres. Geralmente é assintomática e, quando sintomática, mostra-se mais intensa nos homens. Suas complicações mais comuns e graves são a DIP, a gravidez ectópica e a infertilidade (Franceschi *et al.*, 2007). Quando não tratada adequadamente, os indivíduos infectados tornam-se reservatórios para a transmissão da infecção para seus parceiros (Van Doornum *et al.*, 2001).

O diagnóstico da infecção por *N. gonorrhoeae* pode ser realizado por meio de cultura ou por amplificação dos ácidos nucleicos (PCR) (Van Doornum *et al.*, 2001). Métodos tradicionais como cultura, imunoensaio enzimático e marcação com anticorpo fluorescente foram muito utilizados em outras décadas, no entanto, atualmente, muitas técnicas moleculares têm sido empregadas, apresentando diversas vantagens como aumento da sensibilidade e possibilidade de detecção de infecção tanto nos casos sintomáticos quanto nos assintomáticos (Souza *et al.*, 2013).

### **1.2.6 *Treponema pallidum***

O *Treponema pallidum* é o agente etiológico da sífilis, doença crônica sexualmente transmissível, caracterizada por períodos ativos e de latência. A infecção apresenta fases distintas, divididas em primária, secundária, latente e terciária. A transmissão ocorre por contato com as lesões ulcerativas e, em algumas fases, a infecção pode ser assintomática (Ratnam, 2005). A incidência de sífilis tem aumentado consideravelmente nos países desenvolvidos nos últimos anos e ainda não existe um método diagnóstico ideal para a detecção deste microrganismo. O mecanismo de infecção do *T. pallidum* não é completamente elucidado, mas acredita-se que ocorram alterações em proteínas de superfície interagindo com a resposta imune do hospedeiro. O *T. pallidum* não apresenta crescimento em meio de cultura artificial o que dificulta o diagnóstico que, normalmente é realizado por sorologia direta do material da lesão ou então, mais recentemente por meio da PCR (Centurion-Lara *et al.*, 2000; Heymans *et al.*, 2010).

### I.3 Leveduroses Cérvico-Vaginais

As vaginites infecciosas podem ser causadas por bactérias, protozoários ou fungos leveduriformes, os quais são, muitas vezes, habitantes normais da mucosa genital. As leveduroses cérvico-vaginais estão entre os principais problemas ginecológicos que afetam as mulheres em idade reprodutiva, possuindo importância clínica, já que existe grande ocorrência de casos. Acredita-se que 75% das mulheres adultas apresentem um episódio de vulvovaginite fúngica na vida, sendo que destas, 40 a 50% vivenciam novos surtos e 5% adquirem infecção recorrente (Neto, 1999; Álvares *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2008; Feuerschuette *et al.*, 2010).

Considerada um dos principais motivos que levam a mulher à consulta ginecológica, estas infecções fúngicas têm como principais agentes causadores os microrganismos do gênero *Candida* sp., que vêm ganhando significativo aumento de casos descritos. As leveduras deste gênero possuem várias espécies, sendo divididas em dois grandes grupos denominados *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans*. Cerca de 80 a 90% dos casos de candidíase vulvovaginal são ocasionados por *Candida albicans* e 10 a 20% pelas outras espécies não-*albicans*. Dentre este último grupo, as mais frequentes nos processos infecciosos são *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Sobel, 2007; Musial *et al.*, 2009).

Frequentemente a *Candida* sp. é encontrada em neoplasia intraepitelial de baixo grau e, muitas vezes também, a própria infecção fúngica pode funcionar como agente facilitador da infecção por HPV, principalmente devido aos microtraumas e às lesões inflamatórias ocasionadas no epitélio cervical. Tal panorama estabelece uma relação indireta entre o CC e as infecções fúngicas precedentes (Solomon, 2005).

As leveduras que estão presentes na microbiota normal do intestino são auto-transmitidas da região perianal para a vagina, ou então carregadas pelo parceiro pela via sexual, podendo desencadear infecções. No entanto, como estas leveduras costumam colonizar a mucosa, não ocasionando lesões, somente quando encontram um meio propício começam sua multiplicação e expressam seus fatores de virulência, causando infecção com lesões na vulva e vagina, originando candidíase vulvovaginal sintomática (Ferrazza *et al.*, 2005; Dalazen *et al.*, 2011).



As principais sintomatologias apresentadas pelas mulheres infectadas pelas leveduras são prurido, ardência, leucorréia branca amarelada espessa, ausência de odor, dispareunia, placas esbranquiçadas, edema e eritema na vulva e vagina. Não sendo consideradas manifestações clínicas características exclusivamente desta infecção, testes específicos são utilizados para confirmação da suspeita, os quais evidenciam a natureza do agente etiológico. Exames laboratoriais devem ser realizados para que ocorra a diferenciação frente a outras vaginites, podendo ser empregado o tratamento mais adequado a prosseguir (Neto, 1999; Boatto *et al.*, 2007; Dalazen *et al.*, 2011).

Quando presentes no esfregaço citológico, as diferentes espécies de *Candida* são identificadas pela presença de blastosporos e/ou pseudo-hifas eosinofílicas ou marrom-acinzentado corado pela metodologia de Papanicolaou. Geralmente, observa-se concomitante a presença de inflamação em meio a núcleos de leucócitos fragmentados e formação de *rouleaux* de células epiteliais escamosas lancetadas por hifas (Sedaghat e Notopoulos, 2008; Wei *et al.*, 2012). No entanto, a sensibilidade do teste de Papanicolaou é considerada limitada na detecção da candidíase vulvovaginal, sendo que apenas cerca de 25% das pacientes com cultura positiva para levedura são identificadas na citologia. Ainda, é importante ressaltar que o diagnóstico citológico possibilita observar a presença de leveduras e as alterações citológicas ocasionadas, não permitindo a identificação da espécie envolvida (Feuerschuette *et al.*, 2010).

Para a detecção das leveduras potencialmente patogênicas o meio de cultura utilizado com grande frequência na rotina micológica é o ágar Saboraund dextrose, no entanto, devido ao fato de as colônias apresentarem características morfológicas muito semelhantes, o diagnóstico se torna difícil. Para tanto, têm-se utilizado atualmente, meios cromogênicos para identificação presuntiva de algumas espécies de *Candida*, tornando o diagnóstico mais rápido e permitindo diferenciar os agentes etiológicos em um mesmo material clínico. Dentre os meios de cultura cromogênicos, o CHROMagar *Candida*®, meio seletivo e diferencial, se destaca por permitir a diferenciação provável de determinadas espécies de leveduras,

principalmente das mais prevalentes em vulvovaginites fúngicas, confirmando a etiologia do agente (Consolaro *et al.*, 2004; Boatto *et al.*, 2007).

As características apresentadas pelas diferentes espécies de *Candida*, tanto do ponto de vista epidemiológico como terapêutico, demonstram a importância da identificação correta das espécies presentes nas amostras clínicas (Demitto *et al.*, 2012). Sabe-se que a *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada em cultura, no entanto, a ocorrência das espécies não-*albicans* está aumentando consideravelmente, sendo geralmente mais resistentes à terapia com antifúngicos (Consolaro *et al.*, 2004). Acredita-se que este panorama está relacionado com o potencial de virulência e a resistência destes microrganismos aos antifúngicos (Demitto *et al.*, 2012). As infecções causadas por *Candida* sp. resistentes aos antifúngicos estão cada vez mais elevadas, principalmente devido ao uso indevido dos medicamentos antifúngicos e também ao limitado número de opções terapêuticas (Tortorano *et al.*, 2006; Huang e Kao, 2012; Pfaller, 2012).

Dentre os antifúngicos utilizados nos casos de candidíase estão a Anfotericina B, a Anidulafungina e o Fluconazol, sendo que este último é o mais empregado e, conseqüentemente, o desenvolvimento de *C. albicans* e *C. glabrata* resistentes já vêm sendo reportado (Dalben-Dota *et al.*, 2010). As diferentes espécies de *Candida* sp. apresentam padrões distintos de resistência aos antifúngicos, a qual pode se apresentar tanto na forma clínica, por consequência do baixo nível do fármaco no sangue e devido à interação com outros medicamentos ou à imunodepressão do paciente, quanto *in vitro*, considerada secundária, na qual cepas resistentes são selecionadas por prévio contato com antifúngicos. Para tanto, na terapêutica clínica, é necessário considerar a interação entre o hospedeiro, o fármaco e o fungo (Demitto *et al.*, 2012).

#### **I.4 Proteína S100A4**

As alterações celulares e lesões citológicas ocasionadas por diferentes microrganismos, principalmente pelo HPV, provocam mudanças nas funções das células, dentre as quais, a expressão proteica. Alterações na expressão de diversas proteínas podem contribuir nos processos tumorais, sendo um exemplo a proteína S100A4. Esta proteína desempenha diversas funções intra e extra celulares,

interagindo e regulando a atividade de outras proteínas, o que apresenta estrita relação com o desenvolvimento do câncer e metástase (Boye e Mælandsmo, 2010; Donato *et al.*, 2013; Gross *et al.*, 2014; Bresnick *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

Expressa geralmente como homo ou hetero dímero nas células, a proteína S100A4, também denominada mts1, 18A2, CAPL, FSP, Metastina, p9Ka, PEL, 42A, Calvasculin, pertence à família S100, que é composta de cerca de 21 diferentes membros de proteínas ligantes de cálcio do tipo *EF-hand*. É uma proteína pequena, um polipeptídeo contendo 101 aminoácidos, com baixo peso molecular de 11.5 kDa (Gross *et al.*, 2014).

Entre as funções celulares moduladas pela S100A4 estão a fosforilação de proteínas, atividade de enzimas, motilidade, crescimento, proliferação, migração e diferenciação celular. Também tem sido descrita sua atuação em inflamação, transdução de sinal e progressão do ciclo celular, transcrição, angiogênese, contractilidade celular e comunicação célula-célula (Sedaghat e Notopoulos, 2008; Donato *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Em alguns estudos, a S100A4 é utilizada como marcador mesenquimal, onde caracteriza os produtos gerados na transição epitelial-mesenquimal que ocorrem durante o desenvolvimento da fibrose em vários órgãos (Ghoul *et al.*, 2009; Matsuzaki e Darcha, 2012).

Diferenças nos níveis de expressão da S100A4 têm sido demonstradas, no entanto, o mecanismo de ação desta proteína não é totalmente conhecido. Vários trabalhos vêm sendo realizados visando elucidar suas principais características tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*. O nível de expressão da S100A4 parece ser resultado da sua interação com outras proteínas, além de alterações epigenéticas. Dentre as proteínas que são influenciadas pela ação da S100A4, destacam-se as metaloproteinases (Cao *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014) e a p53 (Orre *et al.*, 2013), as quais têm sua função alterada, contribuindo para um fenótipo maligno. Alterações epigenéticas incluindo metilação do DNA, *imprinting* genômico e modificações das histonas também são eventos importantes que podem ocorrer tanto em condições fisiológicas como em patológicas (Boye e Mælandsmo, 2010).

A expressão fisiológica da S100A4 está relacionada à sua atuação na divisão e diferenciação celular. São poucos os relatos de expressão de S100A4 em tecidos

normais, porém, está expressa em epiderme normal (Li *et al.*, 2009), no epitélio das mamas (Bresnick *et al.*, 2015), bem como em linhagens de queratinócitos humanos imortalizados e fibroblastos presentes no estroma tecidual (Grigorian *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009). Em amostras obtidas de pulmão, rim, tireoide, pâncreas e cólon não houve detecção da proteína (Wang *et al.*, 2015).

A capacidade da S100A4 de atuar na invasão tumoral e metástase sugere que esta proteína possa atuar como biomarcador de progressão em vários tipos de câncer. O aumento da expressão de S100A4 é demonstrado em câncer de mama, colo retal, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas de esôfago, carcinoma gástrico e pancreático, onde sua elevada expressão confere um perfil agressivo e metastático a estes tumores (Boye e Mælandsmo, 2010; Bresnick *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Com relação ao sistema reprodutor feminino, estudos demonstram alterações na expressão da proteína S100A4 em carcinoma de ovário (Horiuchi *et al.*, 2012), de endométrio (Xie *et al.*, 2007; Chong *et al.*, 2014), e carcinoma cervical (Jin *et al.*, 2012). No microambiente dos tumores de mama, a maioria das células do estroma são positivas para S100A4, sugerindo que estas modulam a resposta imune tumoral (Bresnick *et al.*, 2015). Em amostras de pacientes com câncer cervical escamoso, a S100A4 também é expressa principalmente no estroma deste tecido. Nas células tumorais, a expressão é considerada fraca, focal ou ausente, e somente as células do estroma respondem aos tratamentos quimioterápicos, apresentando redução da expressão de S100A4 (Jin *et al.*, 2012).

Em lesões precursoras de CC não existem relatos a respeito da expressão da proteína S100A4. Sabe-se que esta proteína é normalmente expressa nas células e fibroblastos do estroma tecidual (Jin *et al.*, 2012), mas ainda não se tem conhecimento de como seria a expressão antes de ocorrer a ruptura da membrana basal, sem invasão do estroma, bem como da interação com a presença do vírus HPV e a consequente expressão de suas oncoproteínas. A identificação da S100A4 como um biomarcador em lesões precoces permitirá melhor diagnóstico e acompanhamento da evolução e progressão do CC.

## II. Objetivos

---



O objetivo geral deste projeto é relacionar os achados citológicos à presença de diferentes agentes infecciosos, em especial o HPV e a expressão da proteína S100A4 em esfregaços cervicais.

Os objetivos específicos propostos são:

1. Relacionar o perfil epidemiológico das pacientes com o diagnóstico citológico e molecular;
2. Determinar a presença de HPV nas amostras analisadas, comparando com o diagnóstico citológico;
3. Genotipar os seis tipos mais comuns de HPV de alto risco em nosso meio (HPV 16, 18, 31, 33, 39 e 45);
4. Determinar a presença de outros agentes infecciosos, entre eles *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, Herpes vírus simples (HSV-1 e HSV-2) e *Treponema pallidum*;
5. Determinar a presença de leveduras do gênero *Candida* e identificando suas espécies, bem como caracterizar seu perfil de sensibilidade frente aos antifúngicos;
6. Relacionar as alterações citológicas encontradas com a presença de diferentes agentes infecciosos presentes nas amostras;
7. Correlacionar o diagnóstico citológico e a detecção de HPV com a expressão da proteína S100A4.





### **III. Artigos Científicos**

---



**III.1 CAPÍTULO 1:** Denise Wohlmeister, Débora Renz Barreto Vianna, Virgínia Etges Helfer, Fabrícia Gimenes, Marcia Edilaine Lopes Consolaro; Regina Bones Barcellos; Maria Lúcia Rossetti; Luciane Noal Calil, Andréia Buffon, Diogo André Pilger. **Association of HPV and *Chlamydia trachomatis* with intraepithelial lesions in cervix samples**

Manuscrito submetido para publicação em 02/06/15 no periódico *Sexually Transmitted Diseases* (impact factor: 2.748).



## Sexually Transmitted Diseases

### Association of HPV and Chlamydia trachomatis with intraepithelial lesions in cervix samples --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Association of HPV and Chlamydia trachomatis with intraepithelial lesions in cervix samples
<b>Article Type:</b>	Original Study
<b>Section/Category:</b>	Laboratory Diagnostics
<b>Keywords:</b>	HPV; C. trachomatis; Intraepithelial lesions; Sexually transmitted diseases.
<b>Corresponding Author:</b>	Diogo André Pilger, Pharmacist, PhD in Medical Sciences Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Denise Wohlmeister, Biomedical, Msc in Pharmaceutical Sciences
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Denise Wohlmeister, Biomedical, Msc in Pharmaceutical Sciences Débora Renz Barreto Vianna, Undergraduate student Virgínia Etges Helfer, Undergraduate student Fabrícia Gimenes, Biologist, PhD in Biological Sciences Marcia Edilaine Lopes Consolaro, Pharmacist, PhD in Biological Sciences Regina Bones Barcellos, Biologist, MSc in Cellular and Molecular Biology Maria Lucia Rosa Rossetti, Pharmacist, PhD in Biochemistry Luciane Noal Calil, Pharmacist, PhD in Medical Sciences Andréia Buffon, Pharmacist, PhD in Biological Sciences and Biochem Diogo André Pilger, Pharmacist, PhD in Medical Sciences
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Suggested Reviewers:</b>	Cleide Gonçalves da Silva , Ph.D Department of Surgery of The Center for Vascular Biology Research at Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard - Boston, USA cdasilva@bidmc.harvard.edu  Marcia Rosangela Wink , Ph.D Laboratório de Biologia Celular, Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, RS, Brazil marciawink@yahoo.com.br  Silvia Stuchi Maria-Engler, Ph.D School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo silvia@usp.br

02/06/2015 Gmail - Fwd: Submission Confirmation for Association of HPV and Chlamydia trachomatis with Intraepithelial lesions in cervix samples



Denise Wohlmelster <de.wohlmelster@gmail.com>

**Fwd: Submission Confirmation for Association of HPV and Chlamydia trachomatis with intraepithelial lesions in cervix samples**

1 mensagem

**Diogo André Pilger** <dlogo.pilger@ufrgs.br>  
 Para: "de.wohlmelster@gmail.com" <de.wohlmelster@gmail.com>

2 de junho de 2015 10:18

----- Mensagem encaminhada de em@editorialmanager.com -----

Data: 2 Jun 2015 09:15:37 -0400

De: Sexually Transmitted Diseases <em@editorialmanager.com>

Responder para: Sexually Transmitted Diseases <std@ucsf.edu>

Assunto: Submission Confirmation for Association of HPV and Chlamydia trachomatis with Intraepithelial lesions in cervix samples

Para: Diogo André Pilger <dlogo.pilger@ufrgs.br>

Dear Dr. Pilger,

Your submission entitled "Association of HPV and Chlamydia trachomatis with intraepithelial lesions in cervix samples" has been received by Sexually Transmitted Diseases.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://std.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Jeanne Moncada, MT  
 Managing Editor  
 Sexually Transmitted Diseases

----- Final da mensagem encaminhada -----

—  
 Prof. Dr. Diogo André Pilger  
 Faculdade de Farmácia  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
 Av. Ipiranga n. 2752 Sala 304 E  
 Porto Alegre, RS, Brasil  
 CEP: 90.610-000  
 Telefone: 51 3308-2102  
 Fax: 51 3308-5437  
[dlogo.pilger@ufrgs.br](mailto:dlogo.pilger@ufrgs.br)

**Association of HPV and *Chlamydia trachomatis* with intraepithelial lesions in  
cervix samples**

Denise Wohlmeister<sup>1,10</sup>, Débora Renz Barreto Vianna<sup>2,10</sup>, Virgínia Etges Helfer<sup>2</sup>,  
Fabrícia Gimenes<sup>3</sup>, Marcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>4</sup>; Regina Bones Barcellos<sup>5</sup>;  
Maria Lucia Rosa Rossetti<sup>6</sup>; Luciane Noal Calil<sup>7,10</sup>, Andréia Buffon<sup>8,10</sup>, Diogo André  
Pilger<sup>9,10\*</sup>.

<sup>1</sup> Biomedical Scientist, Post-graduation Program, Pharmacy College, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (PPGCF/UFRGS).

<sup>2</sup> Undergraduate student, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup> Biologist, PhD in Biological Sciences, Laboratory of Clinical Cytology, State University of Maringá, Brazil.

<sup>4</sup> Pharmacist, PhD in Biological Sciences, Laboratory of Clinical Cytology, State University of Maringá, Brazil.

<sup>5</sup> Biologist, MSc in Cellular and Molecular Biology, Center for Scientific and Technological Development Studies, e Production and Research on Health Studies Foundation, Brazil (CDCT/FEPPS).

<sup>6</sup> Pharmacist, PhD in Biochemistry, Center for Scientific and Technological Development Studies, e Production and Research on Health Studies Foundation, Brazil (CDCT/FEPPS).

<sup>7</sup> Pharmacist, PhD in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (UFRGS).

<sup>8</sup> Pharmacist, PhD in Biological Sciences and Biochemistry, Post-graduation Program Pharmacy College, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (PPGCF/UFRGS).

<sup>9</sup> Pharmacist, PhD in Medical Sciences, Post-graduation Program, Pharmacy College, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (PPGCF/UFRGS).

<sup>10</sup> Laboratory of Biochemical and Cytological Analyses (LABC), Department Analyses, College of Pharmacy, UFRGS, Brazil.

\* Corresponding Author

Dr. Diogo André Pilger,

Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas  
Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga 2752, Bairro Santana

CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: + 55 51 3308 2102

E-mail: diogo.pilger@ufrgs.br

**Word Count:** Summary (25); Abstract (245); Text (3.581); Figures (2); Tables (4).

**Disclosure Statements for Conflicts of Interest:** None for all authors. The authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest.

**Sources of Support:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCTI); Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGCF/UFRGS); Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul; PPSUS 1154-2551/13-1).

**Short summary:** Cervical samples collected during routine gynecological examination were examined. Analyses demonstrated the association between cytological lesions and *Chlamydia trachomatis* and high oncogenic risk HPV genotypes.

**Abstract:**

**Background:** Cervical cancer affects women worldwide, though it is one of the few neoplasias that may be avoided based on the detection of precursor lesions characteristic of human papillomavirus (HPV) infection. HPV infection alone is not enough for the development of cervical cancer, since other factors such as inflammatory and infectious processes may add to the persistence of infection. The



influence of different infectious agents and the association with HPV in cervical carcinogenesis has not been fully elucidated. This study describes the association between cytological change staging of cervical cancer and the detection of the most relevant etiological agents of sexually transmitted diseases (STDs) to establish an investigation strategy complementary to conventional cytology in screening programs. **Methods:** Samples collected from 169 patients were evaluated by conventional cytology followed by molecular analysis to detect HPV DNA, *Chlamydia trachomatis*, *Herpes Simplex Virus 1 and 2*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, and *Treponema pallidum*, besides genotyping for high risk HPV. **Results:** An association between cytological lesions and different behavioral habits such as smoking and sedentariness was observed. Lesions were also associated with HPV and *C. trachomatis* detection. An association was also seen between both simple and multiple genotype infection and cytological changes. **Conclusions:** The conjoint use of conventional cytology and molecular investigation of HPV and *C. trachomatis* proved its importance and may be included in screening programs, since these factors are linked to the early diagnosis and prognosis of patients with precursor lesions of cervical cancer.

**Keywords:** HPV; *Chlamydia trachomatis*; Intraepithelial lesions; Sexually transmitted diseases.

## INTRODUCTION

Cervical cancer is the third most common neoplasia worldwide. Specifically in Brazil, it is the fourth cause of death in women with cancer, and in southern region of the country it comes third in cancer prevalence, after breast and colorectal tumors.<sup>1</sup> Early detection of epithelial lesions in the cervix has proved its value, since prognosis is strongly correlated with stage as defined upon diagnosis.<sup>1-3</sup> Several factors impact cervical carcinogenesis, from behavioral variables to the presence of infectious agents linked with sexually transmitted diseases (STDs). This is true especially for high carcinogenesis risk genotypes of the human papillomavirus (HPV)<sup>4,5</sup>. The specialized literature reports ample evidence that the incidence of HPV is higher in women with secondary genital infections. In this sense the vaginal microenvironment may be considered a cofactor in the pathogenesis of cervical intra-epithelial neoplasia (CIN).<sup>6-8</sup> The influence of different infectious agents and their association with HPV in cervical carcinogenesis has not yet been fully explained, and rare are the studies that evaluate the potential applicability the detection of such agents as a tool in screening programs.

It is believed that persistent HPV infection in the cervical epithelium is facilitated by inflammatory processes caused by other STD pathogens. Among the main etiological agents responsible for STDs that may be potentially involved in cervical carcinogenesis are *Chlamydia trachomatis*, *Herpes Simplex Virus 1 and 2*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, and *Treponema pallidum*, which cause inflammatory processes and microabrasion or microtrauma on the cervical epithelium, deteriorating the infection picture and promoting the persistence of HPV.<sup>9,10</sup>

Cervical Pap smears afford to visualize the presence of microorganisms or cell changes they cause, though the technique sometimes is not sensitive enough to determine the actual etiological agent of these diseases.<sup>7</sup> Used as a complementing tool to conventional cytology, new methods, especially molecular techniques, are consistently developed and show good promise in the more unambiguous identification of microorganisms with a likely role in cervical carcinogenesis.<sup>11</sup>

In this scenario, the present study aimed to investigate the relationship between staging of cytological changes in the cervical epithelium and the presence of the most important etiological pathogens of STDs. In addition, the molecular technique is discussed as a complementary approach to conventional cytology to be considered in screening strategies.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Samples**

In total, 169 samples of the ectocervical and endocervical regions of patients were collected during routine gynecologic examination in privately held medical units in the municipality of Carazinho, southern Brazil. Samples were obtained between March and November 2014. Participants included women at reproductive age. Mean age was  $33 \pm 11$  years (minimum: 15; maximum 64 years). After answering a questionnaire and signing an informed consent form, patients were submitted to the routine collection of cervical specimens. These samples were mounted on cytology slides in a liquid medium kit (DigeneDNA with PAP® - DNA Collection Device - hc2 HPV and CT/GC DNA Tests, EUA), and used for molecular analyses. This research was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do

Sul, Brazil (protocol number 562,824) and carried out according to the 1975 Declaration of Helsinki, 2000 revision.

### **Conventional cytology**

Cervical Pap smears were mounted on slides and stained using the Papanicolaou stain as described by Engler.<sup>12</sup> Optical microscopy was used to evaluate cellular changes, which were interpreted and staged according to the 2001 Bethesda System.<sup>13</sup> Slides were inspected by double-blinded independent cytologists. The interobserver agreement index was assessed based on the classification of ectocervical samples as 'negative for intraepithelial lesion or malignancy ('within normal limits', WNL, or 'reactive or inflammatory benign cellular changes', RI), 'atypical squamous cells of undetermined significance' (ASC-US), 'low-grade squamous intraepithelial lesions' (LSILs), 'cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion' (ASC-H), 'high-grade squamous intraepithelial lesion' (HSIL), and 'squamous cervical carcinoma' (CC). When detected, endocervical changes were classified into 'atypical glandular cells of undetermined significance' (AGUS), 'adenocarcinoma in situ', or 'invasive adenocarcinoma'.

### **Molecular analyses**

#### *DNA extraction*

Samples of the endocervical and ectocervical regions were placed in specific liquid medium and refrigerated at 4 – 8°C upon use. DNA was extracted using the

commercial kit Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

As internal control and a means to ensure quality in the DNA extraction process the  $\beta$ -actin housekeeping gene was amplified for all samples as described by Brugè *et al.*<sup>14</sup>

#### *Detection of HPV DNA*

The qualitative screening test to detect HPV DNA was carried out by conventional polymerase chain reaction (PCR) adapted from Shen-Gunther e Yu (2011) The reaction amplifies the L1 gene to simultaneously detect low- and high-risk HPV DNA, though it does not differentiate the various viral types present in the sample. Briefly, the PCR was carried out using the primers MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') (forward) and MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') (reverse) to a final 25- $\mu$ L volume under the following amplification conditions: preheating (1 min at 95°C); 35 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C); final extension (10 min at 72°C).

#### *HPV genotyping*

The samples that tested positive for HPV in the PCR were investigated for the presence of the most common high oncogenic risk HPV genotypes (HPV 16, 18, 31, 33, 39 and 45) using the microplate colorimetric hybridization assay (MCHA) as described by Barcellos *et al.*<sup>16</sup> First, a 150-bp fragment of the HPV L1 region was amplified using the consensus biotinylated GP5+ and GP6+ primers, followed by hybridization on microplate containing specific probes for subsequent detection by

colorimetry. Amplified fragments were individually hybridized using a probe specific to each viral type in the microplate and, after incubation and rinsing steps, absorbance was read at 450 nm (secondary absorbance at 620 nm) in an automatic microplate reader. The cutoff value for each probe was considered in the analysis and interpretation of respective results. The positive and negative controls used were described in the standardization of the technique.<sup>14</sup>

#### *Detection of other STD pathogens*

The DNA extracted from cervical samples was also used to detect other infectious agents potentially associated with HPV. We designed a multiplex-PCR (M-PCR) assay to achieve simultaneous detection of the seven selected STDs: *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Herpes simplex virus* type 1 and 2 (HSV1 and HSV2) previously standardized and validated by our team members. The sizes of the expected fragments and the sequences of primers used were described and standardized in previous studies.<sup>17,18</sup>

#### **Statistical analyses**

Data were analyzed using the PASW Statistics 18 SPSS (Statistical Package for Social Sciences). Qualitative variables were described as means and standard deviation, and compared using Fischer's exact test. The association between variables was evaluated using Pearson's correlation coefficient. Confidence interval was set at 95% ( $p < 0.05$ ). Interobserver agreement used in the cytological diagnosis

was calculated by confidence statistics based on Cohen's kappa, with  $k > 0.8$  meaning 'excellent',  $k = 0.6 - 0.8$  'good',  $k = 0.4 - 0.6$  'average', and  $k < 0.4$  'poor'.

## RESULTS

Socioeconomic, behavioral, and clinical profiles of patients are shown in Table 1.

### Conventional cytology

The cytological diagnosis was conducted by three independent cytologists, who shared excellent interobserver agreement ( $k = 0.860$ ). Of the 169 patients, 151 (89.3%) presented negative results for intraepithelial lesions or malignancy, of which 75 (49.7%) were WNL and 76 (50.3%) had RI. Eighteen of the 169 samples analyzed (10.6%) were categorized as cytological lesions, which in turn were divided into 4 (22.2%) ASC-US, 10 (55.5%) LSIL, 1 (5.5%) ASC-H, and 3 (16.6%) HSIL. The results were sorted into three distinct groups: (A) within normal limits, (B) reactive or inflammatory benign cellular changes, and (C) atypia or lesions (which included ASC-US, LSIL, ASC-H, and HSL), as shown in Figure 1.

Epidemiological variables were compared to the cytological diagnosis, when some relationships became apparent. The results show that group A was formed mostly by patients with higher education degrees ( $p < 0.05$ ). Patients who exercised and reported vaginal discharges and pruritus were prevalent in group B ( $p < 0.05$ ). In group C, more specifically the patients with positive ASC-US diagnosis, most individuals were smokers ( $p < 0.05$ ).

## Molecular analyses

### *HPV*

All samples analyzed were positive for the  $\beta$ -actin housekeeping gene and were analyzed to detect HPV DNA. Of the 169 samples, 35 (20.7%) presented high and/or low oncogenic risk HPV DNA. In addition, the comparison with the cytological diagnosis demonstrated an association between HPV DNA detection and group C, which comprised the different classes of atypia and cytological lesions (ASC-US, LSIL, ASC-H, and HSIL) ( $p < 0.001$ ), as shown in Table 2. The age group with the highest frequency of cytological changes and HPV detection was the 21 – 30-year-old demographic, though with no statistically significant relationship.

Genotype distribution analysis showed that HPV 39 was the most prevalent, detected in 22 (62.8%) of the 35 positive samples, followed by HPV 16 (21, 60.0%), HPV 31 (11, 31.4%), HPV 18 (9, 25.7%), HPV 33 (9, 25.7%), and HPV 45 (3, 8.6%).

Among the patients positive for HPV DNA, 13 (37.1%) had only one genotype of the virus, while 20 (57.1%) presented more than one viral type, as shown in Table 3. When infection with multiple genotypes are considered, the most frequent associations were HPV 16/39 in 7 (20.0%) samples, HPV 16/18/31/33/39 in 4 (11.4%), and HPV 16/18/31/33 in 3 (8.6%) samples.

Of the 35% samples that were diagnosed positive for HPV, 2 (5.7%) were not positive for the high-risk HPV genotypes investigated. HPV 16 was detected as single genotype in only 3 (8.6%) of samples. In the other specimens analyzed, the genotype occurred together with other HPV subtypes, as multiple infection. Single infection with HPV 18 and HPV 31 was not observed.



The comparison between cytological results and HPV genotype showed that group C presented an association with infection with both single and multiple viral genotypes ( $p < 0.001$ ). Also, an association between ASC-US and multiple infection with HPV 31/39 and HPV 16/18/31/33/39 was observed. LSIL was associated with HPV 16, HPV 39, and HPV 45, and with multiple infections with HPV 16/18/31/33 and HPV 16/39/45. ASC-H was associated with multiple infection with HPV 16/18, while HSIL was linked with multiple infection with HPV 16/18/31/33 ( $p < 0.001$ ).

#### *Detection of STD pathogens*

*Chlamydia trachomatis* was the most prevalent etiological agent of STDs detected in samples, either alone or in coinfection.

The comparison between cytological findings and the analysis of STD pathogens revealed an association between *C. trachomatis* and ASC-H in group C ( $p < 0.05$ ). When the presence of high-risk HPV genotypes is considered in light of the detection of STD pathogens, *C. trachomatis* was associated with the presence of HPV 33 and multiple infection with HPV 16/18. Moreover, higher prevalence of either simple or double infection with HPV 16 and HPV 39 was detected, independently of infection with *C. trachomatis* ( $p < 0.05$ ) (Figure 2).

## **DISCUSSION**

The present study identifies an important association with cervical cytological changes, presence of HPV, and presence of *C. trachomatis*. Such relationship reveals that both agents are linked with early cervical carcinogenesis and prognosis,

pointing to the importance of molecular screening of HPV and *C. trachomatis* as a complementary tool to exfoliative cytology.

The Pap smears analyzed were collected from patients that participated in cervical cancer screening programs. Most women (60.9%) were between 21 and 40 years of age, which represents an appropriate age group, considering the objectives of screening programs and the fact that infections and cytological changes manifest mainly in this demographic.<sup>19</sup>

The analysis of behavioral and clinical profiles of patients shows that most were married women with higher education degrees and who took physical exercise, while few were smokers. Although the cytological diagnosis was normal for roughly half the samples, a large number of patients exhibited active and/or reactive lesions associated with sedentariness and smoking habit. These factors are acknowledged to associate with greater incidence and prevalence of HPV infection. Moreover, the higher the number of cigarettes smoked daily, the greater the risk of cervical cancer, especially when the smoking habit started early in life.<sup>1,20</sup> Another interesting aspect in the population screened is that signs like increased vaginal discharges and symptoms such as pruritus indicate inflammatory process and should prompt the patient to look for medical care, in which case the investigation into the presence of the infectious agents cited should be requested.

Sexual promiscuity is a confirmed risk factor in the spread of HPV infection,<sup>21</sup> though most women in the present study reported having had only 1 or 2 partners at the time this study was carried out. This finding should be interpreted based on the age of patients had the first intercourse (between 15 and 20 years old). Also, the most commonly adopted pregnancy control method was the contraceptive pill, as

published in previous study.<sup>19</sup> The age group that presented the highest frequency of cytological changes was the 21 – 30-year demographic. This age series is believed to be the time at which the early manifestations of cervical cancer occur, confirming the importance of preventive exams.<sup>6,22</sup>

The prevalence of cytological changes observed in the present study may be considered high, when compared with the findings published in the literature.<sup>23</sup> Nevertheless, the prevalence of cytological changes seems to vary across geographical regions, which are covered under different approaches to screening programs. In addition, in some Brazilian states, especially in the south and northeast, such initiatives are allegedly far too infrequent.<sup>24</sup> It should be stressed that the samples analyzed in the present study were collected from follow-up patients, who may have been more prone to manifesting the changes diagnosed. Furthermore, the fact that the participants with a record of changes or infections were more motivated to take part in this research, increasing the frequency of changes observed, should not be ruled out.

Exfoliative cytology was originally developed and is presently used as a routine screening method to detect cervical changes and precursor lesions to cervical cancer.<sup>25</sup> In recent years this technique also became important in the diagnosis of inflammations and infections of the female genital system, to detect morphological changes triggered by various viral, bacterial, and fungal types.<sup>25,26</sup> Yet, exfoliative cytology does not provide good sensitivity levels and therefore other techniques are employed, mainly molecular methods. Here, qualitative PCR afforded to detect HPV DNA in 20.7% of the samples, a number that presented good correlation with

cytological changes (ASC-US, LSIL, ASC-H, and HSIL), with higher frequency of LSIL (28.6%).

Of the patients with negative diagnosis of intraepithelial lesion or malignancy, 11.2% were positive for HPV DNA, of which 6.0% were within normal levels and 5.2% presented reactive benign inflammatory changes. A screening effort carried out in 2007 demonstrated the prevalence of 10.4% of HPV in samples collected from patients with normal cytological results across the world.<sup>27</sup> The same study revealed that in South America this prevalence was as high as 12.3%.<sup>27</sup> This finding draws attention to the feasibility to detect HPV before it causes any cytological lesion, in which case patients may be more suitably followed up.<sup>28</sup> Interestingly HPV infection may likewise be asymptomatic and transient, and spontaneous clearance can occur in 80% of cases, when the virus is flushed by the host's immune system — with no ensuing cell changes. In roughly 20% of women HPV infection may be persistent and subsequently evolving into cervical cancer in up to 10% of cases.<sup>29,39</sup> Therefore, it should be stressed that the molecular investigation of HPV in young patients with negative cytology findings should be employed with caution and on a case-by-case basis. Though molecular methods are more sensitive, specificity falls short from that afforded by cytological tests, especially in high-stage lesions.<sup>31</sup> In the USA the test is indicated only for patients with cytologically diagnosed lesions staged above ASC-US or as a cotesting strategy for women over 30 year of age.<sup>32</sup>

High oncogenic risk HPV genotypes may infect the epithelium persistently, inducing lesion progression and contributing to carcinogenesis. Research has shown that the most common high risk HPV genotypes detected in carcinoma cases are HPV 16, 18, 31, 33, 39, and 45.<sup>16,33-35</sup> HPV 39, which is quite prevalent in Latin

American populations, has been detected at high frequencies both in isolation and in coinfection with other genotypes.<sup>35</sup> HPV 39 is one of the genotypes most commonly associated with LSIL, and is held accountable for a mere 3% of cervical cancer worldwide.<sup>36</sup> In a study carried out in southern Brazil, Entiauspe *et al.* demonstrated that HPV 16 was the most prevalent genotype, followed by HPV 18. HPV 16 was also highly prevalent in the population examined in the present study. Besides, it is the main genotype detected in squamous carcinomas.<sup>37</sup> Interestingly, HPV 18 is among the most prevalent worldwide, though in the samples analyzed in the present study it was comparatively less prevalent than other genotypes and was not even detected as sole genotype in any of the patients examined. The main underlying reason may be the fact that HPV 18 is involved mostly in cases of adenocarcinoma or adenosquamous carcinoma, which represents only 5% of cervical cancers.

Relevant findings of the present study include the simultaneous presence of more than one HPV genotype in the same sample and the association of these genotypes with the diagnosis of cytological changes. Here, the presence of one genotype is more prevalent in LSIL cases, while higher-stage lesions were characterized by multiple HPV genotypes. This reveals the importance of identifying the HPV type, since a mere positive (or negative) result does not afford such analysis of the HPV genotype present in the sample. Another important aspect is the possibility that the presence of more than one viral type indicates exposure of a patient to a risk factor. Previous studies have shown that infection with multiple HPV genotypes increases the risk of intraepithelial lesions, though the prevalence of these multiple genotype infections did not vary across the different intraepithelial lesion stages.<sup>38</sup>

Only 5.7% of the samples positive for HPV DNA were not positive for the high risk HPV genotypes screened, proving the effectiveness of the first reaction. These samples may be considered positive for low risk HPV or positive for other high risk HPV genotypes that are not detected by the probes used.

STD pathogens are also contributing factors for HPV infection and tumor progression. These pathogens cause inflammatory processes and epithelial lesions, worsening the picture concerning virus lodging and persistence.<sup>28</sup> The detection of etiological agents of STDs by amplification of nucleic acids is considered more sensitive than conventional microscopy or culture methods.<sup>39</sup> Among the samples diagnosed with reactive or benign cellular changes, 16.2% were positive in the molecular detection of one or more STD etiological agents. In turn, 83.8% presented unspecific inflammatory characteristics, and the etiological agent was not detected. The relationship between smears positive for inflammation and the diagnosis of malignancy has been reported, and the study by Og *et al.*<sup>25</sup> suggests that these infections may hide premalignant and malignant changes, requiring treatment of the inflammatory process prior to any cytological diagnosis effort.

Most samples in which an etiological agent of a STD was detected had negative findings for intraepithelial lesion or malignancy (WNL/RI). A distinct result was observed for HPV infection, which was more prevalent in patients with atypia or intraepithelial lesions. In addition, 53.6% of patients who recounted symptoms like vaginal discharge or pruritus also were positive for one or more pathogens.

The prevalence of the different etiological agents of STDs observed in the present study draws attention to the high prevalence of *C. trachomatis* and to the relationship this microorganism establishes with HPV. It is believed that *C.*

*trachomatis* infection may affect HPV infection and persistence, since the condition allegedly increases the rates of transformation and of progression of precursor lesions.<sup>40</sup> Since the infection is asymptomatic in most cases, it may go by untreated and thus become a persistent infection that favors chronic inflammation. Moreover, we found that only 25% of patients positive for *C. trachomatis* reported a symptom, such as abundant vaginal discharge or pruritus, which once again underscores the importance of molecular screening. It is known that *C. trachomatis* induces not only chronic inflammation but also damage to epithelial tissue and inflammatory pelvic disease.<sup>41</sup> Infection occurs in immature endocervical cells, prompting an epithelial transformation called metaplasia. Therefore metaplasia may be seen as a potential factor associated with high risk of HPV infection, since this virus preferably infects metaplastic epithelia.<sup>42,43</sup> The present study shows the association between *C. trachomatis* infection and the presence of characteristic cytological changes such as ASCH-H and different HPV genotypes. In spite of the low number of *C. trachomatis* and HPV coinfections observed (4, 2.4%), an association was noticed both for single and multiple high risk HPV genotype infections, lending strength to the hypothesis that infection with *C. trachomatis* may be one of the cofactors of cervical carcinoma, together with inflammation and infection with HPV.

In turn, the inclusion of other pathogens in screening programs should be viewed with caution. This initiative may be interesting only when patients have an infection history, exhibit symptoms, or have predisposing factors.

In light of the clear association between the emergence of lesions and the possibility of progression into cervical cancer, the molecular investigation of HPV and *C. trachomatis* stands as a justifiable approach for samples that undergo prior

cytological screening. Such indication should be interpreted in light of the limitations of conventional diagnosis procedures to detect important microorganisms that may lead to inflammation, worsening the carcinogenesis scenario. Therefore, the association of different techniques affords a more sensitive and specific diagnosis, and helps in the early identification and follow-up of precursor lesions of cervical cancer.



## References

1. INCA. Instituto Nacional do Cancer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014. [INCA webiste]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.
2. Hartmann KE, Hall SA, Nanda K, Boggess JF, Zolnoun D. Screening for cervical cancer. 2002. [Europepmc website]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2002 Jan. Systematic Evidence Reviews, No. 25. Available from: <http://europepmc.org/books>. Accessed Dec 10, 2014.
3. World Health Organization. WHO guidance note: Comprehensive cervical cancer prevention and control: A healthier future for girls and women. 2013. ISSN 9244505142. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78128/3/9789241505147\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78128/3/9789241505147_eng.pdf?ua=1). Accessed Feb 12, 2015.
4. Schiffman M, Solomon D. Cervical-Cancer Screening with Human Papillomavirus and Cytologic Cotesting. *New Engl J Med*. 2013;369(24):2324-2331.
5. Al-Daraji WI, Smith JH. Infection and cervical neoplasia: facts and fiction. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2(1):48.
6. Murta EFC, Souza M, Júnior E, Adad S. Infecção pelo papilomavírus humano em adolescentes: relação com o método anticoncepcional, gravidez, fumo e achados citológicos. *Rev Bras Gineco Obstet*. 2001;23(4).
7. Martins MCL, Bôer CG, Svidzinski TIE, et al. Avaliação do método de Papanicolaou para triagem de algumas infecções cérvico-vaginais. *Rev Bras Anal Clin*. 2007;39(3):217-221.

8. Campos ACC, Freitas-Junior R, Ribeiro LFJ, Paulinelli RR, Reis C. Prevalence of vulvovaginitis and bacterial vaginosis in patients with koilocytosis. *Sao Paulo Med J.* 2008;126(6):333-336.
9. Rodriguez-Cerdeira C, Sanchez-Blanco E, Alba A. Evaluation of association between vaginal infections and high-risk human papillomavirus types in female sex workers in Spain. *ISRN Obstetr Gynecol.* 2012; 2012:7. Available from: < <http://dx.doi.org/10.5402/2012/240190> >.
10. Muvunyi CM, Dhont N, Verhelst R, et al. Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens. *Diagn Micr Infect Dis.* 2011;71(1):29-37.
11. Rodrigues AD, Cantarelli VV, Frantz MA, Pilger DA, Pereira FdS. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. *J Bras Patol Med Lab.* 2009;45(6):457-462.
12. Engler MELCSSM. Técnicas de Processamento e Rastreamento dos Esfregaços Citológicos Cérvico Vaginais. In: Roca, ed. *Citologia Clínica Cérvico-Vaginal* 2012:31-42.
13. Solomon D, Nayar R. *Sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal.* 2a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2005.
14. Brugè F, Venditti E, Tiano L, Littarru G, Damiani E. Reference gene validation for qPCR on normoxia-and hypoxia-cultured human dermal fibroblasts exposed to UVA: is  $\beta$ -actin a reliable normalizer for photoaging studies? *J Biotechnol.* 2011;156(3):153-162.

15. Shen-Gunther J, Yu X. HPV molecular assays: defining analytical and clinical performance characteristics for cervical cytology specimens. *Gynecol Oncol*. 2011;123(2):263-271.
16. Barcellos RB, Almeida SEdM, Sperhacke RD, et al. Evaluation of a novel microplate colorimetric hybridization genotyping assay for human papillomavirus. *J Virol Methods*. 2011;177(1):38-43.
17. Souza RP, de Abreu AL, Ferreira ÉC, et al. Simultaneous Detection of Seven Sexually Transmitted Agents in Human Immunodeficiency Virus–Infected Brazilian Women by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(6):1199-1202.
18. Gimenes F, Medina FS, de Abreu ALP et al. Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. *PloS One*. 2014;9(6):e98862.
19. Batista JE, Monteiro SG, do Nascimento Moraes OKD et al. Fatores associados ao vírus hpv e lesões cervicais em mulheres quilombolas/factors associated with hpv virus and cervical lesions in quilombola women. *Rev Pesq Saúde*. 2014;15(1); 218-222.
20. Kaderli R, Schnüriger B, Brügger LE. The impact of smoking on HPV infection and the development of anogenital warts. *Int J Colorectal Dis*. 2014;29(8):899-908.
21. Pinheiro MM, Queiroz LLC, da Silva Queiroz RCC, Lima JMMP. HPV E o desenvolvimento de neoplasias: uma revisão integrativa de literatura. *Rev Cien Saúde*. 2013;15(1); 19-27

22. Falcão GB, Ibiapina FLP, Feitosa HN, et al. Factors associated with Pap smear for the prevention of cervical cancer in a low income urban community. *Cad Saúde Col.* 2014;22(2):165-172.

23. de Melo SCCS, Prates L, de Barros Carvalho MD, Pelloso SM, Marcon SS. Alterações citopatológicas e fatores de risco para ocorrência do câncer de colo uterino. *Rev Gaúcha Enfermagem.* 2009;30(4):602.

24. da Silva Correa M, da Silveira DS, Siqueira FV, et al. Cobertura e adequação do exame citopatológico de colo uterino em estados das regiões Sul e Nordeste do Brasil Pap test coverage and adequacy in the South and Northeast of Brazil. *Cad. Saúde Pub.* 2012;28(12):2257-2266.

25. Og A, Oe O, To A. Sensitivity of a papanicolaou smear in the diagnosis of candida albicans infection of the cervix. *North Am Jo Med Sci.* 2010;2(2):97.

26. Kashyap V, Bhambhani S. Incidence and Cytomorphological Peculiarities of Lower Genital Tract Infections in Vault (Post Hysterectomy) Smears Versus Pap Smears from Non-Hysterectomy Subjects: A Retrospective Study. *J Obst Gynecol India.* 2011;61(5):558-561.

27. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(7):453-459.

28. Entiauspe LG, Teixeira LO, Mendoza-Sassi RA, Gonçalves CV, Gonçalves P, Martinez AMBd. Papilomavírus humano: prevalência e genótipos encontrados em mulheres HIV positivas e negativas, em um centro de referência no extremo Sul do Brasil. *Revi Soc Bras Med Trop.* 2010;43(3):260-263.

29. Abreu A, Souza RP, Gimenes F, Consolaro M. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Viol J.* 2012;9:262.

30. Bringhenti MEZ, Dozza TG, Dozza TG et al. Prevenção do câncer cervical: associação da citologia oncótica a novas técnicas de biologia molecular na detecção do papilomavírus humano (HPV). *DST-J Bras Doenças Sex Transm.* 2010;22(3):135-140.

31. Whitlock EP, Vesco KK, Eder M, Lin JS, Senger CA, Burda BU. Liquid-based cytology and human papillomavirus testing to screen for cervical cancer: a systematic review for the US Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2011;155(10):687-697.

32. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: End of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol.* 2015;136:189-197.

33. Kraus I, Molden T, Holm R, et al. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1310-1317.

34. Parkin DM, Almonte M, Bruni L, Clifford G, Curado M-P, Pineros M. Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the Latin America and Caribbean region. *Vaccine.* 2008;26:L1-L15.

35. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000;19(1):1-5.

36. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by

geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidem Biomark.* 2005;14(5):1157-1164.

37. Oliveira-Silva M, Lordello CX, Zardo L, Bonvicino CR, Moreira M. Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. *Virology*. 2011;8(4): 1-6.

38. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, et al. Multiple human papillomavirus infections with high viral loads are associated with cervical lesions but do not differentiate grades of cervical abnormalities. *J Clin Microbiol.* 2013;51(5):1458-1464.

39. Schmitt M, Depuydt C, Stalpaert M, Pawlita M. Bead-based multiplex sexually transmitted infection profiling. *J Infection.* 2014. 69(2):123-133

40. de Abreu AL, Nogara PR, Souza RP, et al. Molecular detection of HPV and *Chlamydia trachomatis* infections in Brazilian women with abnormal cervical cytology. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(6):1149-1151.

41. Bellaminutti S, Seraceni S, De Seta F, Gheit T, Tommasino M, Comar M. HPV and *Chlamydia trachomatis* co-detection in young asymptomatic women from high incidence area for cervical cancer. *J Med Virol.* 2014;86(11):1920-1925.

42. Urbina MT, Medina R, Muñoz G, Sánchez V, Benjamín I, Lerner J. Infección por *Chlamydia trachomatis*. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2010;70(2):90.

43. Deluca GD, Basiletti J, Schelover E, et al. *Chlamydia trachomatis* as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(6):567-572.

**Figure legends:**

**Figure 1.** Cytological samples stained using the Papanicolaou technique and classified into three groups according to the 2001 Bethesda System (400x): A) negative for intraepithelial lesion or malignancy within normal limits, (B) negative for intraepithelial lesion or malignancy with reactive or inflammatory benign cellular changes, (C) Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSILs), and (D) High-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL).

**Figure 2.** Frequency distribution of *C. trachomatis* in samples considering the different high oncogenic risk HPV genotypes. \* indicates association between HPV and positive result for *C. trachomatis*.

Figura1

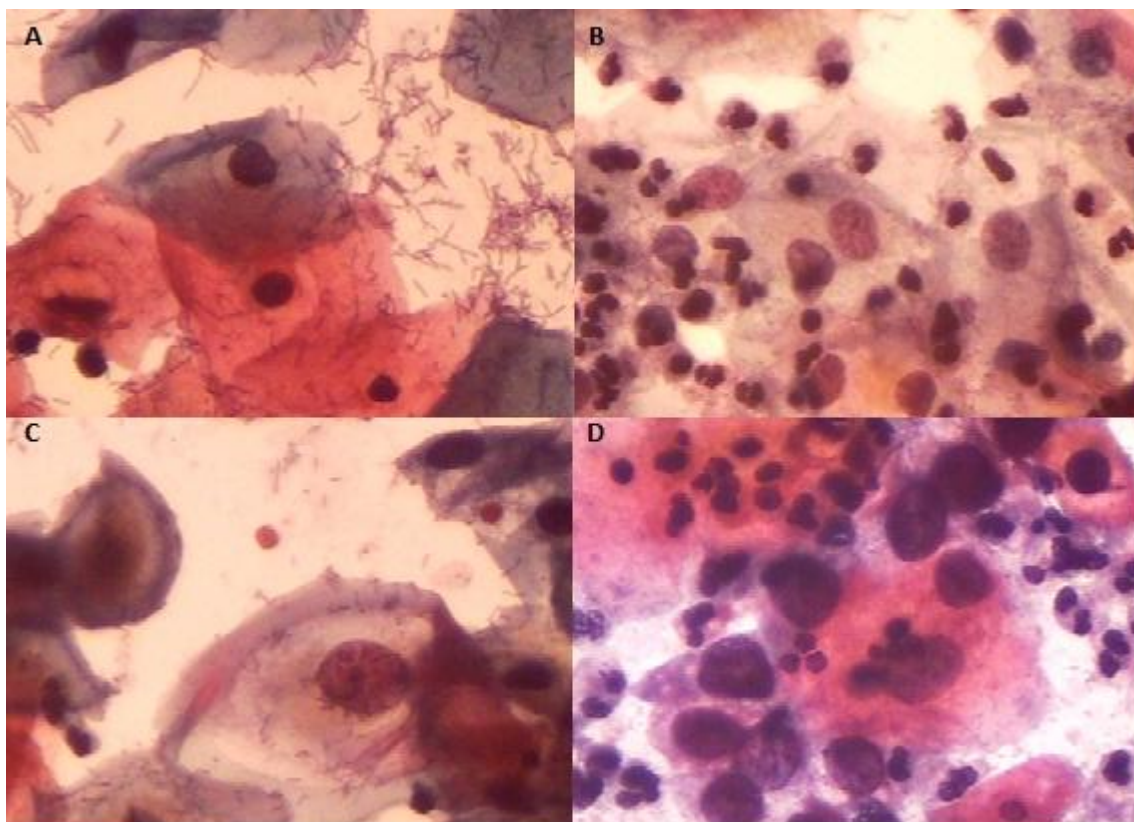
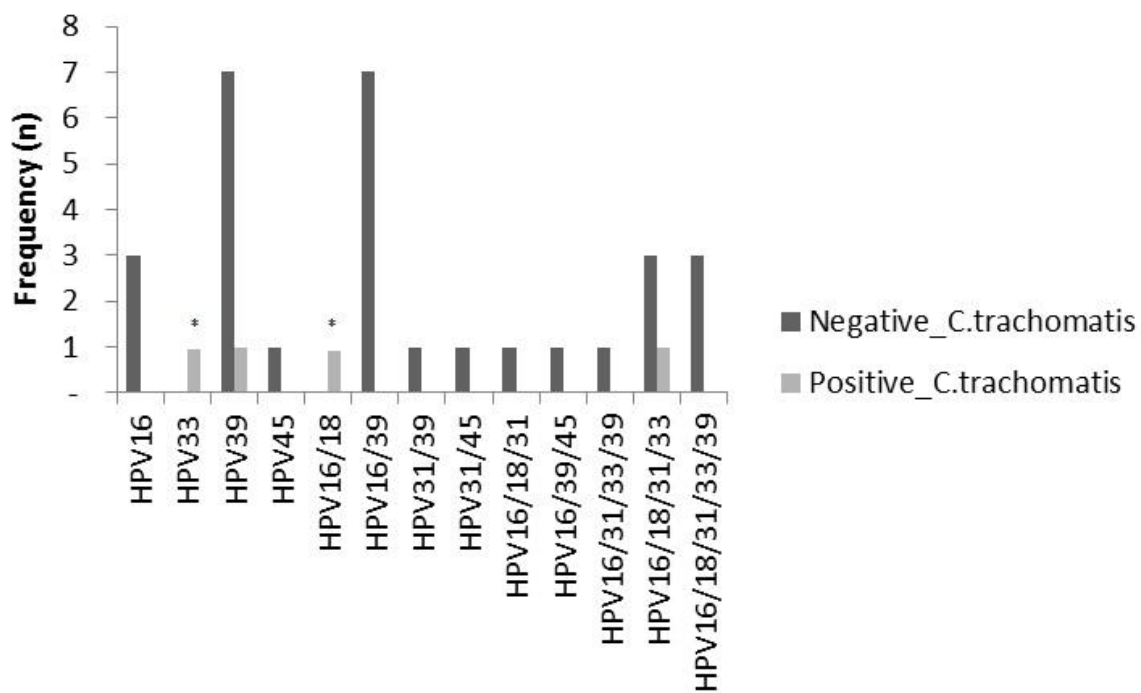




Figura 2



**Table 1:** Socio-demographic characteristics, behavioral and clinical of patients.

	Frequency (n)	Percentage (%)
<b>Age Group</b>		
15 to 20 years	16	9.5
21 to 30 years	60	35.5
31 to 40 years	43	25.4
41 to 50 years	29	17.2
>50 years	16	9.5
UM	5	3.00
<b>Level of education</b>		
Elementary School	43	25.4
High School	56	33.1
Higher Education	68	40.2
UM	2	1.2
<b>Marital status</b>		
Maiden	47	27.8
Married	92	54.4
Steady partner (1 year)	16	9.5
Divorced	10	5.9
Dowager	4	2.4
<b>Smoking</b>		
Yes	18	10.6
No	149	88.2
UM	2	1.2
<b>Regular physical activity (2-3 times / week)</b>		
Yes	64	37.9
No	102	60.4
UM	2	1.8
<b>Age of earlier sexual activity</b>		
10 to 14 eyars	20	11.8
15 to 20 eyars	125	74.0
21 to 30 eyars	18	10.6
UM	6	3.5
<b>Sexual partners during life</b>		
1 to 2 partners	84	49.7
3 to 5 partners	44	26.0
6 to 10 partners	15	8.9
11 to 15 partners	1	0.6

	Frequency (n)	Percentage (%)
>16 partners	4	2.4
UM	21	12.4
<b>Parity</b>		
No children	66	39.0
1 to 2 children	82	48.5
3 to 5 children	18	10.6
6 to 10 children	2	1.2
UM	1	0.6
<b>Contraceptive method</b>		
None	38	22.5
Oral contraceptive	99	58.6
Intra Uterine Device (DIU)	5	3.0
Condom	8	4.7
Sterilization	8	4.7
Injectable	11	6.5
<b>Hormone replacement</b>		
Yes	9	5.3
No	158	93.5
UM	2	1.2
<b>HPV infection history</b>		
Yes	35	20.7
No	131	77.5
UN	3	1.8
<b>Uterus cancer history</b>		
Yes	1	0.6
No	166	98.2
UM	2	1.2
<b>Uterine cancer in Family</b>		
Yes	28	16.6
No	136	80.5
UM	5	3.0
<b>Symptoms - Vaginal discharge/itching</b>		
Yes	56	33.1
No	104	61.5
UM	9	5.3

UN: Uninformed; HPV: Human Papillomavirus

**Table 2:** Cytological Diagnosis and HPV Infection

<b>Cytological Diagnosis</b>	<b>Number of Samples (%)</b>	<b>Cases HPV DNA Positive (N)</b>	<b>Statistics</b>
Group A	75 (44.4)	8	
Group B	76 (45.0)	9	
Group C	18 (10,6)	18	p<0,001

HPV: Human Papillomavirus

**Table 3:** Frequency multiplex detection of HPV from HPV-positive samples

<b>HPV</b>	<b>Patients (N)</b>	<b>Frequency (%)</b>
<b>Negative HPV <i>HR</i> prospect</b>	2	5,7
<b>1 genotype <i>HR</i></b>	13	37,1
<b>2 genotype <i>HR</i></b>	10	28.6
<b>3 genotype <i>HR</i></b>	2	5.7
<b>4 genotype <i>HR</i></b>	4	11,4
<b>≥5 genotype <i>HR</i></b>	4	11.4
<b>TOTAL</b>	<b>35</b>	<b>100</b>

HR: High-Risk Oncogenic / HPV: Human Papillomavirus

**Table 4:** Frequency Distribution of Infectious Agents

<b>Multiplex</b>	<b>Cases (N)</b>	<b>Frequency (%)</b>
Negative	98	58.0
HPV	35	20.7
<i>Chlamydia trachomatis</i>	16	9.5
<i>Trichomonas vaginalis</i>	8	4.7
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2	1.2
<i>Mycoplasma genitalium</i>	3	1.8
<i>Herpes Simplex virus type 1 (HSV1)</i>	4	2.4
<i>Herpes Simplex virus type 2 (HSV2)</i>	1	0.6
<i>Treponema pallidum</i>	2	1.2
<b>Total</b>	<b>169</b>	<b>100</b>
<b>Coinfections</b>		
<i>Chlamydia trachomatis</i> + HPV	4	2.4
<i>Chlamydia trachomatis</i> + HSV1	1	0.6
<i>Chlamydia trachomatis</i> + HSV1 + <i>Treponema pallidum</i>	1	0.6
<i>Chlamydia trachomatis</i> + <i>Mycoplasma genitalium</i>	1	0.6
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>4.2</b>

HPV: Human Papillomavirus / HSV: *Herpes Simplex virus*

III.2 CAPÍTULO 2: Denise Wohlmeister, Débora Renz Barreto Vianna, Virgínia Etges Helfer, Marco Antônio Zonta, Luciane Noal Calil, Andréia Buffon, Alexandre Meneghello Fuentefria; Diogo André Pilger. **Associação da citologia cérvico-vaginal e da cultura micológica aumentam a detecção de espécies de *Candida* sp. em mulheres sintomáticas**

Manuscrito redigido conforme orientações aos autores a ser submetido em periódico da área.

## ASSOCIAÇÃO DA CITOLOGIA CÉRVICO-VAGINAL E CULTURA MICOLÓGICA AUMENTAM A DETECÇÃO DE ESPÉCIES DE CANDIDA EM MULHERES SINTOMÁTICAS

Denise Wohlmeister<sup>1,2</sup>, Débora Renz Barreto Vianna<sup>1</sup>, Virginia Etges Helfer<sup>1</sup>, Marco Antônio Zonta<sup>4</sup>, Luciane Noal Calil<sup>1</sup>, Andréia Buffon<sup>1,2</sup>, Alexandre Meneghello Fuentefria<sup>2,3</sup>; Diogo André Pilger<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC). Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>3</sup> Laboratório de Micologia Aplicada. Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>4</sup> Departamento de Patologia e Citopatologia da Universidade de Santo Amaro e Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp. Laboratório In Cito – Diagnóstico Citológico

### **\*Autor Correspondente:**

Dr. Diogo André Pilger,  
Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS  
Av. Ipiranga 2752, Bairro Santana  
CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.  
Phone: + 55 51 3308 2102  
E-mail: diogo.pilger@ufrgs.br

**Pequeno Título:** Associação entre Citologia e Micologia

### **Contagem Artigo:**

Resumo: 150 palavras

Texto: 4.959 palavras



## RESUMO

A coinfeção por microrganismos como *Candida* sp pode contribuir para a persistência do HPV e o câncer cervical. A aplicabilidade da pesquisa micológica associada à citologia cérvico-vaginal ainda é controversa. Para tanto, este estudo visa avaliar esta associação, identificando as espécies de *Candida* e seus perfis de sensibilidade aos antifúngicos. Analisaram-se citologicamente 169 amostras cervicais e realizou-se cultura micológica em agar Saboraud seguida de CHROMagar Candida®. Verificou-se o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos através da microdiluição em caldo. A espécie mais prevalente entre os 50 isolados, foi *C.albicans*, seguida da *C.glabrata* e *C.krusei*. A Anidulafungina foi considerada mais eficaz na terapia antifúngica, seguida da Anfotericina e, a maioria dos isolados apresentou resistência ao Fluconazol. Portanto, devido à variabilidade do perfil de sensibilidade aos antifúngicos, a identificação correta da espécie de *Candida* e a realização de testes de susceptibilidade são imprescindíveis na terapêutica adequada da candidíase vulvovaginal, complementando o diagnóstico citológico.

**Palavras-chave:** Candidíase, Colo do útero, Lesão intraepitelial cervical, Cultura micológica.

## 1. Introdução

O diagnóstico das lesões intraepiteliais e dos processos infecciosos relacionados, realizado por meio da citologia cervicovaginal, é considerado grande aliado na prevenção do câncer cervical. É de suma importância a identificação precoce de fatores que possam contribuir para o desenvolvimento da neoplasia uterina, a qual ainda acomete grande número de mulheres, com cerca de 15.590 casos registrados no último ano no Brasil (Inca, 2014). A infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) é o principal fator desencadeador desta doença, resultando na transformação das células do epitélio cervical e, conseqüentemente, lesões pré-cancerosas que poderão evoluir para o câncer propriamente dito (Irion e Buffon, 2009; Uyar e Rader, 2014). De acordo com relatos da literatura, a incidência de HPV é maior em mulheres com outras infecções genitais, sendo que a flora microbiana vaginal pode ser considerada cofator na patogenia da neoplasia intraepitelial cervical. Lesões induzidas pelo HPV podem estar associadas com infecções vaginais, entre elas a infecção por *Candida* sp., encontrada em cerca de 25% das mulheres com infecção pelo vírus. (Murta *et al.*, 2001; Solomon, 2005; Martins *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2008).

Através da realização do exame citológico, nem sempre é possível identificar o agente causal da inflamação, pois sua metodologia foi desenvolvida visando à identificação das alterações celulares presentes nas lesões precursoras do câncer do colo do útero, permitindo somente avaliar a intensidade da reação inflamatória e acompanhar sua evolução. (Martins *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2009). A sensibilidade da técnica de Papanicolaou é de apenas 25% em pacientes com cultura positiva para candidíase vulvovaginal, tornando necessária uma técnica complementar microbiológica na rotina diagnóstica de amostras cervicais (Feuerschuetz *et al.*, 2010). Entretanto, a pesquisa micológica em complementação à citologia cérvico-vaginal não é rotina nos serviços de rastreamento, sendo seu benefício ainda controverso.

As características apresentadas pelas diferentes espécies de *Candida*, tanto do ponto de vista epidemiológico como terapêutico, demonstram a importância da identificação correta das espécies presentes nas amostras clínicas (Demitto *et al.*, 2012). As infecções causadas por *Candida* sp. resistentes aos antifúngicos estão cada vez mais elevadas, principalmente devido ao uso incorreto desses fármacos e também ao limitado número de opções terapêuticas disponíveis (Tortorano *et al.*, 2006; Huang e Kao, 2012; Pfaller, 2012). Dentre os antifúngicos utilizados nos casos de candidíase estão a Anfotericina B, Anidulafungina e o Fluconazol, sendo que este último é o mais empregado e, conseqüentemente com o maior número de relatos de resistência (Dalben-Dota *et al.*, 2010; Marchaim *et al.*, 2012).

Considerando este cenário, este trabalho visa avaliar o impacto da realização do exame de cultura micológico em complementação à citologia cérvico-vaginal como estratégia de identificação de potenciais fatores de risco da carcinogênese cervical, caracterizando as espécies de *Candida* mais prevalentes e seus perfis de sensibilidade aos principais antifúngicos.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Amostras

Foram avaliadas 169 mulheres em idade reprodutiva durante consulta ginecológica de rotina, no município de Carazinho/RS, no período de março a novembro de 2014. A amostragem foi proveniente de participação voluntária em consulta ginecológica de rotina, não sendo considerada populacional.

A coleta ocorreu por meio de raspado ecto/endo cervical com espátula de Ayre e escova ginecológica, sendo confeccionadas lâminas para análise citológica convencional. Para análise micológica, as escovas utilizadas foram inoculadas em tubo contendo meio específico nutritivo denominado caldo Saboraund com Cloranfenicol.

Variáveis como idade, presença de sintomas como secreção vaginal ou prurido e histórico de candidíase, foram avaliadas por meio da aplicação de questionário. Foram excluídas do estudo mulheres em período menstrual ou gestacional.

### 2.2 Análise Citológica

As lâminas com esfregaços cervicais foram fixadas e coradas de acordo com a coloração de Papanicolaou, conforme descrito por Engler (2012). As amostras citológicas foram avaliadas por dois citologistas independentes, considerando o índice de concordância interobservador. Os aspectos celulares e eventuais alterações encontradas foram classificados de acordo com o Sistema Bethesda 2001 (Jin *et al.*, 2012) em Negativo para Malignidade (Dentro dos Limites da Normalidade/DLN ou Reativo/Inflamatório - RI), Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASCUS), Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (LSIL), Células Escamosas Atípicas quando não se pode excluir lesão de alto grau (ASCH), Lesão Intraepitelial de Alto Grau (HSIL), e Carcinoma Escamoso. No caso de alterações glandulares, a classificação utilizada foi Atipia de Células Glandulares (AGUS), Adenocarcinoma in situ e Adenocarcinoma.

### 2.3 Pesquisa de leveduras do gênero *Candida* sp.

As leveduras presentes nas amostras cervicais foram isoladas a partir da inoculação da escova ginecológica em tubos contendo caldo Saboraund com Cloranfenicol, meio nutriente específico, os quais foram incubados em estufa a 37°C por 24h. Posteriormente, uma alíquota da amostra foi semeada em placa de Petry contendo ágar Saboraund e incubada em estufa a 37°C. As leituras foram realizadas após 24 horas e 48 horas de crescimento.

Para as amostras identificadas como positivas anteriormente, seguiu-se com a determinação das espécies de *Candida* por meio da semeadura em placas com o meio CHROMagar *Candida*®, meio cromogênico diferencial para identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais foram incubadas à temperatura de 32°C. As colônias verdes, azul acinzentadas, lilás e rosada, respectivamente das espécies de *Candida* citadas anteriormente, foram evidenciadas

em leituras realizadas após 24 horas e 48 horas de incubação (Araujo *et al.*, 2005; Corrêa *et al.*, 2009).

#### **2.4 Teste de Susceptibilidade aos Antifúngicos**

Após identificação, as espécies de *Candida* isoladas foram testadas para verificar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos. As diferentes cepas isoladas das amostras clínicas foram analisadas em uma concentração de  $1.5 \times 10^6$  células/mL, por meio do teste de microdiluição em caldo. O meio de cultura utilizado foi *RPMI Medium 1640* (Gibco®), tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico/MOPS (LudwigBiotec®) pH 7.0. Os antifúngicos escolhidos foram Anfotericina B, Anidulafungina e Fluconazol, de acordo com a prevalência da escolha para tratamento da candidíase na região. A concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos foi determinada de acordo com o protocolo M27-A3 estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). As concentrações dos antifúngicos variaram entre 1.9 e 500µg/mL e alíquotas de 100µL foram inoculadas em placas de 96 poços com fundo plano, as quais foram incubadas por 24 e 48 horas em estufa a 37°C. A interpretação da concentração inibitória mínima de cada uma das espécies de *Candida* sp. isoladas também foi determinada de acordo com o protocolo M27-A3, suplementado com M27-S4 de 2012.

Todas as determinações foram feitas em duplicata. Para garantia da qualidade do experimento, foi realizado controle negativo da técnica, o qual foi constituído apenas de meio de cultura RPMI e, controle positivo, no qual houve a incubação do inóculo com a suspensão de leveduras, sem a presença dos antifúngicos.

#### **2.5 Ética**

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS sob número 562.824 e as pacientes foram incluídas no estudo mediante assinatura voluntária do termo de consentimento livre e esclarecido.

#### **2.6 Análise Estatística**

A análise estatística constituiu-se da apresentação dos eventos em número absoluto, percentuais e médias. A associação entre as variáveis foi verificada por meio do Teste Exato de Fisher's utilizando o software PASW Statistics 18/SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) e o nível de significância foi de 5% ( $p < 0.05$ ), com intervalo de confiança de 95%. Na análise citológica, o nível de concordância interobservador foi calculado por meio da estatística de confiabilidade com o teste kappa de Cohen, onde  $k > 0.8$ : excelente;  $k = 0.6-0.8$ : bom;  $k = 0.4-0.6$ : regular;  $k < 0.4$ : ruim.

### 3. Resultados

A média de idade das pacientes foi de  $33 \pm 11$  anos, sendo que a idade mínima foi 15 e a máxima 64 anos. Dentre essas pacientes, 56 (33.13%) apresentaram sintomas como secreção vaginal ou prurido, enquanto que 113 (66.86%) foram assintomáticas. O diagnóstico citológico foi realizado por dois citologistas, os quais apresentaram índice de concordância interobservador excelente ( $k=0.860$ ). Analisando-se a distribuição referente ao diagnóstico citológico, observou-se que das 169 pacientes, 151 (89.34%) foram classificadas como Negativas para Lesão Intraepitelial ou Malignidade, sendo 75 (44.4%) consideradas DLN e, 76 (45%) com RI; outras 18 (10.6%) amostras foram classificadas com alterações citológicas, as quais incluem 4 (2.4%) casos de ASCUS, 10 (5.9%) casos de LSIL, 1 (0.6%) de ASCH e 3 (1.8%) de HSIL.

Com relação aos microrganismos identificados no teste citológico, o mais frequente foi lactobacilos, encontrado em 91 (53.8%) pacientes, seguido de 28 (16.6%) casos de *Gardnerella vaginalis*; 26 (15.4%) de flora mista com cocos e bacilos, 9 (5.3%) de esporos ou pseudo-hifas de *Candida* sp., 4 (2.4%) de flora cocóide e 1 (0.6%) de *Trichomonas vaginalis*. Em 10 (5.9%) pacientes a flora foi considerada escassa.

Entre todas as 169 pacientes avaliadas, foi identificada cultura positiva para *Candida* sp. em 50 (29.58%) pacientes, sendo que o diagnóstico citológico ....

Dentre estas amostras, foram isoladas 36 (21.30%) casos de *C. albicans*, 10 (5.91%) de *C. glabrata* e 2 (1.18%) de *C. krusei*. Em 2 (1.18%) pacientes foi detectada positividade para *C. albicans* e *C. glabrata* simultaneamente por meio da identificação por CHROMagar®. Verificou-se também que dentre as 50 (29.58%) pacientes que apresentaram positividade para cultura, apenas 9 (5.32%) pacientes tiveram identificação de leveduras no teste citológico, sendo que dessas, 6 (66.66%) apresentaram cultura positiva para *C. albicans* e 3 (33.33%) para *C. glabrata*.

Dentre as 56 participantes sintomáticas, 21 (37.50%) apresentaram associação com a positividade em cultura para *C. albicans* ( $p<0.001$ ). Outras 4 (7.14%) amostras foram positivas para *C. glabrata*, 2 (3.57%) amostras para *C. krusei*, apenas 1 (1.78%) para *C. albicans* e *C. glabrata* e; 28 (50%) não apresentaram crescimento em cultura.

Com relação às 113 (66.86%) pacientes assintomáticas, 15 (13.27%) apresentaram positividade em cultura para *C. albicans*, 6 (5.30%) *C. glabrata* e 1 (0.88%) *C. albicans* e *C. glabrata*, no entanto sem associação estatisticamente significativa. As outras 91 (80.53%) amostras não apresentaram positividade em cultura ( $p<0.001$ ), conforme exposto na Tabela 1.

Houve associação entre a positividade em cultura para *Candida* sp. e a presença de sintomas característicos como secreção vaginal e prurido ( $p<0.001$ ), representado por 28 (16.56%) pacientes. Outras 22 (13.01%) pacientes apresentaram positividade em cultura, no entanto não relataram presença dos sintomas. Não houve correlação estatisticamente significativa entre a presença de lesões intraepiteliais e atipias citológicas com o teste de cultura micológica. No entanto, pode-se observar que a identificação das leveduras no teste citológico associou-se com a positividade na

cultura para *Candida* sp. ( $p < 0.001$ ). Além disso, observou-se uma associação entre a ausência de sintomas característicos e a ausência de crescimento em cultura para *Candida* sp. ( $p < 0.001$ ). Observou-se também associação entre cultura positiva para *Candida* sp. e o diagnóstico citológico com alterações celulares benignas reativas ( $p < 0.05$ ), entre o histórico de candidíase e a presença de *C. albicans* e *C. krusei* ( $p < 0.01$ ) e entre a detecção de leveduras no citopatológico e a presença de *C. albicans* e *C. glabrata* no diagnóstico por meio da cultura micológica ( $p < 0.001$ ).

Relacionando-se a idade das pacientes e o diagnóstico micológico, verificou-se que a faixa etária compreendida entre 21 e 30 anos apresentou maior prevalência de infecção por *C. albicans* e *C. glabrata*, com 41.66% e 40.00% dos casos, respectivamente. Os isolados de *C. Krusei* foram identificados na faixa etária entre 21 e 30 anos e também entre 41 e 50 anos. No entanto, não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre a idade e o diagnóstico citológico.

O teste de susceptibilidade aos antifúngicos Anfotericina B, Anidulafungina e Fluconazol foi realizado em 46 isolados das amostras clínicas das pacientes. Destes, 35 (78.26%) foram identificados como *C. albicans*, 9 (17.39%) *C. glabrata* e 2 (4.34%) *C. krusei*. A prevalência do perfil de susceptibilidade das diferentes espécies de *Candida* sp. está demonstrada na Tabela 2. Todos os 35 isolados de *C. albicans* apresentaram perfil sensível para Anidulafungina, no entanto, para o Fluconazol, 13 apresentaram sensibilidade, 5 (14.28%) apresentaram resistência intermediária e 17 (48.57%) isolados apresentaram perfil resistente e a este antifúngico. A grande maioria dos isolados de *C. albicans*, composta por 33 (94.28%) casos, apresentou sensibilidade, e apenas 2 (5.72%) isolados apresentaram perfil resistente ao antifúngico Anfotericina B.

Dentre os isolados de *C. glabrata*, a maioria, composta de 6 (66.66%) isolados apresentaram sensibilidade, 2 (22.22%) isolados apresentaram resistência intermediária e 1 (11.11%) isolado apresentou perfil resistente ao antifúngico Anidulafungina. Para o Fluconazol, 6 (66.66%) isolados apresentaram resistência intermediária e 3 (33.33%) apresentaram perfil resistente. Para Anfotericina B, houve 8 (88.88%) casos com perfil sensível e somente 1 (11.11%) caso apresentou resistência.

Entre os isolados de *C. krusei*, 1 (50%) apresentou sensibilidade e outro (50%) apresentou perfil resistente à Anidulafungina. O perfil de susceptibilidade ao Fluconazol não foi realizado devido ao padrão de resistência intrínseca da espécie para este antifúngico. Os dois isolados foram sensíveis à Anfotericina B.

#### 4. Discussão

Nesse trabalho, observamos uma elevada frequência de detecção de *Candida* sp., especialmente da espécie *C. albicans*, em amostras de raspado cervical, corroborando com estudos de Marchaim *et al.* (2012), que reportam que a *C. albicans* é a espécie mais frequentemente envolvida nos casos de candidíase vulvovaginal. Este dado ressalta a importância da realização do exame de cultura micológica, principalmente em pacientes com sintomatologia característica.

No teste de Papanicolaou, a presença de *Candida* sp. é identificada pela presença de blastosporos e/ou pseudo-hifas. Estudos de Moriarty *et al.* (2009) ressaltam ainda que as alterações inflamatórias encontradas nos esfregaços corados pelo método associadas à infecção por *Candida* sp. estão bem estabelecidas e incluem aumento nuclear, halos perinucleares, hipercromasia e queratinização citoplasmática. Entretanto, estas mudanças celulares ocasionadas pela presença de *Candida* sp., podem muitas vezes ser interpretadas erroneamente como atípicas ou lesões pré-neoplásicas.

Quanto à citologia inflamatória, neste trabalho pode-se observar que grande parte das amostras foram classificadas como reativas/inflamatórias e, destas, 14.20% apresentaram positividade em cultura, sendo que somente 5.30% foram detectadas através do teste citológico de Papanicolaou. Portanto, sua aplicação na triagem das infecções é limitada e, nem sempre se consegue determinar o agente causal, sendo necessárias técnicas complementares, como exame de cultura micológica, para isolamento e identificação microbiológica do agente infeccioso, conforme descrito por Martins *et al.* (2007) e Irion e Buffon (2009).

Considerando evidências de estudos realizados por Corrêa *et al.* (2009), a positividade em cultura normalmente é mais prevalente em pacientes sintomáticas, o que se confirmou em nossos resultados, demonstrando maior positividade (56%) nas pacientes que apresentaram sinais e sintomas. A detecção micológica sem a ocorrência de sintomas também ocorreu em 44% dos casos e, conforme Corrêa *et al.* (2009) e Souza *et al.* (2009), isso pode ser consequência de tratamento anterior inadequado com uso insuficiente de antifúngicos, tornando estes resistentes aos fármacos existentes.

Nos casos onde há suspeita clínica de candidíase, a cultura é considerada padrão ouro para o diagnóstico, não podendo ser substituída pelo teste de Papanicolaou. De acordo com Feuerschuetz *et al.* (2010) e Og *et al.* (2010), a maior desvantagem do teste de Papanicolaou é a incapacidade de detectar infecções leves, quando comparada com resultados da cultura micológica. Para um diagnóstico mais específico, Nadeem *et al.* (2010) destacam que o uso de meios cromogênicos no isolamento e identificação presuntiva de diferentes espécies de *Candida* pode ser empregado na rotina laboratorial, sendo considerado um método de fácil execução, requerendo pouco tempo e custo.

Com relação aos sintomas, Ragunathan *et al.* (2014) citam que a maioria das infecções por *C. albicans* são assintomáticas, devido principalmente ao desequilíbrio entre a colonização e fatores do hospedeiro. Nesse trabalho, observou-se a prevalência de infecção pela espécie *C. albicans*, a qual foi a espécie mais frequente tanto nos casos sintomáticos (37.50%) como assintomáticos (13.27%). A *C. glabrata* foi identificada com prevalência de 7.14% nos casos sintomáticos e 5.30% nos casos assintomáticos. Para tanto, ressalta-se a importância da identificação correta da espécie causadora da candidíase, independente da sintomatologia.

Nossos resultados demonstram uma prevalência de detecção de *C. albicans* de 37.50% em mulheres com sintomas de secreção vaginal e prurido. Desta forma, fica evidente a indicação da

realização do exame de cultura micológica, principalmente neste tipo de população. Embora tenhamos encontrado um número relevante de pacientes com positividade para *C. albicans* e assintomáticas, observamos que o exame de cultura micológica não é indicado como avaliação inicial para este grupo de pacientes, devido ao seu custo mais elevado, maior tempo para o diagnóstico final e presença de falso-positivo, em decorrência da colonização assintomática.

Referente às espécies de *Candida* isoladas das pacientes com cultura positiva, através do CHROMagar®, foram identificadas, na grande maioria *C. albicans*, em 72% dos casos, seguida por 20% de *C. glabrata*, e 4% de *C. krusei*, corroborando com os dados de Zhang *et al.* (2014) e Souza *et al.* (2009), os quais descrevem que cerca de 80 a 90% dos casos de candidíase vulvovaginal são causados por *C. albicans* e os outros 10 a 20% são compostos pelas outras espécies, denominadas *Candida não-albicans*.

Embora a prevalência das espécies “não-albicans” seja baixa em relação a de *C. albicans*, a identificação da espécie através da utilização de meios cromogênicos é recomendada, principalmente em função da aquisição de resistência quando tratadas inadequadamente. A existência de uma ampla variedade de antifúngicos e diversos padrões de susceptibilidade das diferentes espécies de *Candida* torna necessária a realização de testes de susceptibilidade aos antifúngicos, para que a conduta clínica seja efetiva (Ragunathan *et al.*, 2014). O aumento dos casos de *Candida não-albicans* dificulta o diagnóstico e tratamento das candidíases vulvovaginais, pois estas espécies apresentam elevadas taxas resistência frente aos antifúngicos azólicos (Dharmik *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Ragunathan *et al.*, 2014).

Estudos demonstram que a prevalência das diferentes espécies de *Candida* variam de acordo com a região geográfica, fatores socioeconômicos e de saúde (Zhang *et al.*, 2014). Nas amostras clínicas avaliadas, a *C. albicans* foi a espécie isolada com maior prevalência e, todos os isolados apresentaram perfil sensível a Anidulafungina, a qual foi capaz de inibir o crescimento em baixas concentrações. A prevalência de isolados sensíveis à Anfotericina B também foi alta, sendo que apenas 5.72% dos casos apresentaram resistência a este antifúngico. Para o Fluconazol, os diferentes isolados de *C. albicans* apresentaram variações no perfil de sensibilidade, sendo que grande parte apresentou resistência, diferente do padrão relatado por Ragunathan *et al.* (2014) e Zhang *et al.* (2014) que demonstraram que esta espécie apresenta sensibilidade a maioria dos Azóis.

A maioria dos isolados *C. glabrata* apresentou perfil sensível ao antifúngico Anidulafungina, e para Anfotericina B, no entanto para o Fluconazol, os isolados apresentaram perfis distintos, variando entre perfil resistente e com resistência intermediária, sendo necessária uma concentração maior para que o crescimento seja inibido, confirmando que o grupo de *Candida não-albicans* apresenta resistência a este tipo de antifúngico (Ragunathan *et al.*, 2014).

Na população estudada, a *C. krusei* foi pouco prevalente e está descrita na literatura por apresentar uma resistência intrínseca ao Fluconazol (Zhang *et al.*, 2014). Ambos os isolados apresentaram perfil sensível à Anfotericina B e para Anidulafungina o padrão de susceptibilidade



apresentou variação entre sensibilidade e resistência. Acredita-se que os fatores do hospedeiro possam interferir neste perfil.

Analisando-se globalmente os dados relativos ao perfil de sensibilidade, o antifúngico considerado mais eficaz para combater as espécies de *Candidas* isoladas, tanto das amostras de pacientes sintomáticas como assintomáticas, foi a Anidulafungina. Por ser utilizada nos casos de candidemia e outras formas de candidíase sistêmica, seu emprego se restringe a apenas casos mais graves ou que apresentam infecção por espécies com baixa sensibilidade ou resistência aos demais antifúngicos, pois apresenta atividade antifúngica excelente (Demitto *et al.*, 2012). A Anfotericina B, também demonstrou efeito e, é descrita por possuir alta eficácia, mas elevada toxicidade, sendo utilizada na maioria das vezes somente de forma tópica. O Fluconazol é o antifúngico mais empregado nos casos de candidíase vulvovaginal, no entanto, 43.47% dos isolados apresentaram resistência, devendo seu uso ser avaliado com cuidado. Este dado é extremamente importante, considerando o amplo emprego do Fluconazol na rotina de tratamento da candidíase. Recomenda-se, portanto, realizar a avaliação do perfil de sensibilidade antes do início da conduta terapêutica, padrão semelhante ao empregado para a utilização de antibioticoterapia frente a agentes bacterianos.

Considerando que a incidência de HPV é maior em mulheres com outras infecções genitais, como espécies do gênero *Candida*, e que flora microbiana vaginal pode ser cofator na patogenia da neoplasia intraepitelial cervical, a implementação de técnicas complementares à citologia para detecção de células leveduriformes virulentas presentes nas amostras cervicais é fundamental. O teste de Papanicolaou é considerado um método bastante específico e sensível, quando realizado por profissional devidamente especializado e treinado, voltado para identificação das alterações celulares, no entanto, no que se refere às infecções presentes, sua sensibilidade é limitada, principalmente por sua coloração ser desenvolvida com a finalidade de visualizar alterações celulares decorrentes de lesões precursoras do câncer e não a microbiologia presente (Og *et al.*, 2010).

A cultura micológica é considerada essencial, tanto na identificação das espécies de leveduras presentes, quanto para acompanhamento da tendência de mudança na microbiologia vaginal, ocasionada principalmente pelo uso inadequado de medicamentos (Ragunathan *et al.*, 2014). O diagnóstico micológico por meio de isolamento em Agar Saboraund seguido do CHROMagar Candida® se mostrou eficiente na detecção e identificação de leveduras presentes no trato genital feminino com sintomatologia sugestiva, sendo considerado um teste aplicável paralelamente ao teste de Papanicolaou na pesquisa de leveduroses cérvico-vaginais, contribuindo conseqüentemente para o melhor rastreamento do câncer de colo de útero. Associado a isso verificamos a importância da realização de testes de susceptibilidade aos antifúngicos, para que se possa estabelecer uma conduta clínica mais adequada e eficaz para cada espécie isolada.

### **Financiamento**

Os autores gostariam de agradecer o CNPq, o PPGCF/UFRGS e a PROPESq agências brasileiras de suporte financeiro.

### Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse para realizar esta pesquisa.

### REFERÊNCIAS

- ARAUJO, C. R. D. et al. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMagar (TM) *Candida*. *Rev. patol. trop*, v. 34, n. 1, p. 37-42, 2005.
- CAMPOS, A. C. C. et al. Prevalence of vulvovaginitis and bacterial vaginosis in patients with koilocytosis. *Sao Paulo Medical Journal*, v. 126, n. 6, p. 333-336, 2008.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras. Norma aprovada. 3. ed. Norma M27-A3 do NCCLS. Estados Unidos, 2008
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras. Norma aprovada. 3. ed. Norma M27-S4 do NCCLS. Estados Unidos, 2012.
- CORRÊA, P. D. R. et al. Phenotypic characterization of yeasts isolated from the vaginal mucosa of adult women. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 31, n. 4, p. 177-181, 2009.
- DALAZEN, D. et al. Comparison of susceptibility profile among clinical isolates of oral and vulvovaginal *Candida* spp. in southern Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011.
- DALBEN-DOTA, K. F. et al. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 16, n. 3, p. 285-290, 2010.
- DEMITTO, F. D. O. et al. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. in vitro among patients from Regional University Hospital of Maringá-PR. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 48, n. 5, p. 315-322, 2012.
- DHARMIK, P. G.; GOMASHE, A.; UPADHYAY, V. Susceptibility Pattern of Various Azoles Against *Candida* Species Causing Vulvovaginal Candidiasis. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, v. 63, n. 2, p. 135-137, 2013.
- ENGLER, M. E. L. C. S. S. M. Técnicas de Processamento e Rastreamento dos Esfregaços Citológicos Cérvico Vaginais. In: ROCA (Ed.). *Citologia Clínica Cérvico-vaginal*, cap. 3, p.31-42, 2012.
- FEUERSCHUETTE, O. H. M. et al. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. *Femina*, v. 38, n. 1, 2010.
- HUANG, M.; KAO, K. C. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *FEMS microbiology letters*, v. 333, n. 2, p. 85-93, 2012.
- INCA. Instituto Nacional do Cancer José Alencar Gomes da Silva. p. Estimativa 2014 2014.

Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> >.

- IRION, C. I.; BUFFON, A. Avaliação da adequabilidade das amostras de exames citopatológicos realizados em um laboratório de Porto Alegre–RS no ano de 2000. *RBAC*, v. 41, n. 3, p. 217-20, 2009.
- JIN, L. et al. Immunohistochemical expression of Annexin A2 and S100A proteins in patients with bulky stage IB–IIA cervical cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Gynecologic oncology*, v. 126, n. 1, p. 140-146, 2012.
- LIU, X. et al. Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, v. 24, n. 2, p. 106-111, 2014.
- MARCHAIM, D. et al. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstetrics & Gynecology*, v. 120, n. 6, p. 1407-1414, 2012.
- MARTINS, M. C. L. et al. Avaliação do método de Papanicolaou para triagem de algumas infecções cérvico-vaginais. *RBAC*, v. 39, n. 3, p. 217-221, 2007.
- MORIARTY, A. T. et al. Performance of *Candida*-Fungal-Induced Atypia and Proficiency Testing: Observations From the College of American Pathologists Proficiency Testing Program. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 133, n. 8, p. 1272-1275, 2009.
- MURTA, E. F. C. et al. Infecção pelo papilomavírus humano em adolescentes: relação com o método anticoncepcional, gravidez, fumo e achados citológicos. *Rev Bras Gineco Obstet*, v. 23, n. 4, 2001.
- NADEEM, S. G.; HAKIM, S. T.; KAZMI, S. U. Use of CHROMagar *Candida* for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan Journal of Medicine*, v. 5, n. 1, 2010.
- OG, A.; OE, O.; TO, A. Sensitivity of a papanicolaou smear in the diagnosis of *Candida albicans* infection of the cervix. *North American journal of medical sciences*, v. 2, n. 2, p. 97, 2010.
- PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012.
- RAGUNATHAN, L. et al. Phenotypic Characterization and Antifungal Susceptibility Pattern to Fluconazole in *Candida* species Isolated from Vulvovaginal Candidiasis in a Tertiary Care Hospital. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, v. 8, n. 5, p. DC01, 2014.
- SOLOMON, D. N., RITU. Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal. Segunda Rio de Janeiro, 2005.
- SOUZA, P. et al. Prevalence of *Candida* sp. in the cervical–vaginal cytology stained by Harris–Shorr. *Archives of gynecology and obstetrics*, v. 279, n. 5, p. 625-629, 2009.
- TORTORANO, A. M. et al. *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *International journal of antimicrobial agents*, v. 27, n. 5, p. 359-366, 2006.
- UYAR, D.; RADER, J. Genomics of Cervical Cancer and the Role of Human Papillomavirus Pathobiology. *Clinical chemistry*, v. 60, n. 1, p. 144-146, 2014.
- XIE, R. et al. S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF- $\beta$ 1 signaling.

Laboratory investigation, v. 89, n. 8, p. 937-947, 2009.

ZHANG, J. Y. et al. Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. *Mycoses*, v. 57, n. 10, p. 584-591, 2014.

**Tabela 1** - Relação entre cultura micológica e presença de sintomas característicos

Cultura	Sintomáticas			Assintomáticas			Total	
	Número de Pacientes (n)	Frequência (%)	p	Número de Pacientes (n)	Frequência (%)	P	Número de Pacientes (n)	Frequência (%)
<i>C. albicans</i>	21	37.50	P<0.001	15	13.27	-	36	21.30
<i>C. glabrata</i>	4	7.14	-	6	5.30	-	10	5.91
<i>C. Krusei</i>	2	3.57	-	0	0	-	2	1.18
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	1	1.78	-	1	0.88	-	2	1.18
Cultura Negativa	28	50	-	91	80.53	p<0.001	119	70.41
<b>TOTAL</b>	<b>56</b>	<b>33.13</b>		<b>113</b>	<b>66.86</b>		<b>169</b>	<b>100</b>

**Tabela 2** - Distribuição da frequência de isolados de *Candida* sp. de acordo com o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos

Espécie	Anfotericina B			Anidulafungina			Fluconazol		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>C. albicans</i>	33	-	2	35	0	0	13	5	17
<i>C. glabrata</i>	8	-	1	6	2	1	0	6	3
<i>C. krusei</i>	2	-	0	1	0	1	-	-	-

Legenda – S: Sensível; I: Intermediária; R: Resistente

**III.3 CAPÍTULO 3:** Denise Wohlmeister, Débora Renz Barreto Vianna, Patrícia Nardin, Carlos Alberto Saraiva Gonçalves, Luciane Noal Calil, Andréia Buffon, Diogo André Pilger. **S100A4 Protein Physiologically Expressed in Squamous Epithelium and Reduced in Precursor Lesions of Cervical Cancer**

Manuscrito redigido conforme orientações aos autores a ser submetido em periódico da área.

## **S100A4 PROTEIN PHYSIOLOGICALLY EXPRESSED IN SQUAMOUS EPITHELIUM AND REDUCED IN PRECURSOR LESIONS OF CERVICAL CANCER**

Denise Wohlmeister<sup>1,8</sup>, Débora Renz Barreto Vianna<sup>2,8</sup>, Patrícia Nardin<sup>3,9</sup>, Carlos Alberto Saraiva Gonçalves<sup>4,9</sup>, Luciane Noal Calil<sup>5,8</sup>, Andréia Buffon<sup>6,8</sup>, Diogo André Pilger<sup>7,8\*</sup>.

<sup>1</sup> Biomédica, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGCF/UFRGS).

<sup>2</sup> Graduanda Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup> Farmacêutica, Doutora em Ciências Biológicas/Bioquímica.

<sup>4</sup> Médico, Doutor em Ciências Biológicas/Bioquímica.

<sup>5</sup> Farmacêutica, Doutora em Ciências Médicas.

<sup>6</sup> Farmacêutica, Doutora em Ciências Biológicas/Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGCF/UFRGS).

<sup>7</sup> Farmacêutico, Doutor em Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGCF/UFRGS).

<sup>8</sup> Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>9</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

### **\*Corresponding author:**

Dr. Diogo André Pilger

Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS

Av. Ipiranga 2752, Santana

CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: + 55 51 3308 2102

E-mail: diogo.pilger@ufrgs.br

**Running Title:** S100A4 in cervical squamous epithelium

### **Article's Counts:**

Abstract: 235 words

Text: 5554 words

16 pages

Tables: 2

Figuras: 5



## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Infection with Human Papillomavirus (HPV), the main etiologic agent of cervical cancer, results in epithelium transformations that cause changes in gene function and protein expression. The S100A4 protein is involved in cell differentiation and proliferation, inflammation and metastasis, however, there are few data regarding its pattern of expression in precursor lesions of cervical cancer or even in normal epithelium. Therefore, this study aims to verify the possibility of S100A4 to act as biomarker for progression of cervical carcinoma, evaluating its expression profile in cervical samples with precursor lesions and in those considered negative for intraepithelial lesion or malignancy and comparing its expression to the presence of HPV. **METHODS:** Cervical smear samples from 37 patients were evaluated by immunocytochemical technique and classified according to cytological diagnosis and molecular HPV detection. **RESULTS:** The results showed a variation in the protein labeling intensity according to different parameters. It was verified the S100A4 expression in normal epithelial cells, which varied according to the maturation degree of the cervical epithelium, of which basal cells presented higher expression of S100A4 as well as inflammatory smears. In samples with cytopathic alterations caused by HPV, there was a reduced expression of S100A4, which may be due to different molecular mechanisms of the virus. **CONCLUSION:** Therefore, we suggest that the assessment of S100A4 protein expression can assist the diagnosis of cervical intraepithelial lesions positive for HPV that are precursors of cervical cancer.

**Keywords:** S100A4; Precursor lesions; Cervical cancer; HPV; Immunocytochemistry.

## INTRODUCTION

Cervical cancer is considered the third most common cancer worldwide, accounting for the high morbidity and mortality rates of the female population (Ferlay *et al.*, 2010). However, the development of this disease can be prevented through the diagnosis of precursor lesions identified in Pap test and also through the detection of human papillomavirus (HPV), considered the main factor of carcinogenesis. The cells of precursor lesions infected with HPV undergo changes in their gene function as well as in their protein expression and may act as biomarkers of tumor evolution (Schiffman e Solomon, 2013; Tornesello *et al.*, 2013). The research of new biomarkers and therapeutic targets is of paramount importance, as there are few studies related to this approach in cervical cancer.

The S100A4 (MTS1, 18A2, CAPL, FSP, Metastin, p9Ka, PEL, 42A, Calvasculin) is a small protein, low molecular weight, containing 101 amino acids, which belongs to a family composed of about 21 calcium binding proteins, termed S100 (Gross *et al.*, 2014). Several intra and extracellular functions are modulated by S100A4, which include phosphorylation of proteins, enzyme activity, cell motility, growth, proliferation, migration and differentiation. It has also been described its role in

inflammation, signal transduction and cell cycle progression, transcription, angiogenesis, cell contractility and cell-cell communication (Sedaghat e Notopoulos, 2008; Donato *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). In some studies, S100A4 is used as a mesenchymal marker, in which characterizes the products from the epithelial-mesenchymal transition which occurs during the development of fibrosis in various organs (Ghoul *et al.*, 2009; Matsuzaki e Darcha, 2012).

The S100A4 level of expression seems to be the result of interaction with other proteins, rather than epigenetic changes. Among the proteins that are affected by the action of S100A4, we can highlight metalloproteinases (Cao *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2014) and p53 (Orre *et al.*, 2013), which can have their function altered, contributing to a malignant phenotype. Epigenetic alterations including DNA methylation, genomic imprinting and histone modifications are also important events that can occur in both physiological and pathological conditions (Boye e Mælandsmo, 2010). The physiological expression of S100A4 is related to its role in cell division and differentiation. There are few reports of S100A4 expression in normal tissues, however, this protein is expressed in normal epidermis (Li *et al.*, 2009), in breast epithelium (Bresnick *et al.*, 2015), as well as in immortalized human keratinocytes and fibroblasts lines found in the tissue stroma (Grigorian *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009). The protein was not detected in samples obtained from lung, kidney, thyroid, pancreas and colon (Wang *et al.*, 2015).

The S100A4 ability to act in tumor invasion and metastasis suggests that this protein may serve as a biomarker of tumor progression and invasiveness in several cancers. The increase of S100A4 expression is demonstrated in breast and colorectal cancer, osteosarcoma, squamous cell esophageal carcinoma, gastric and pancreatic carcinoma, where its high expression gives an aggressive and metastatic profile to these tumors (Boye e Mælandsmo, 2010; Wang *et al.*, 2015). Regarding the female reproductive system, studies showed changes in the S100A4 expression in ovarian (Horiuchi *et al.*, 2012), endometrial (Xie *et al.*, 2007; Chong *et al.*, 2014) and cervical carcinoma (Jin *et al.*, 2012). In samples from patients with squamous cervical cancer, S100A4 is mainly expressed in the tissue stroma. In tumor cells, the expression is considered weak, focal or absent, and only the stromal cells respond to chemotherapy resulting in reduced S100A4 expression (Jin *et al.*, 2012).

Cervical cancer cell lines have been used to demonstrate the S100A4 expression pattern. In HeLa line, there are reports of increased invasiveness, cell motility and migration, promoted by S100A4 (Wang *et al.*, 2015). In addition, silencing of genes involved in tumor progression causes a reduction in the S100A4 expression and therefore attenuates invasion and metastasis capacity (Wang *et al.*, 2015). The silencing of S100A4 also showed reduced cell number and cell viability in HeLa lines (Orre *et al.*, 2013), however, squamous cell carcinoma KOSC-3 cell line has a different response to the expression of S100A4, because when the protein expression occurs, the invasion ability, demonstrated in vitro, is inhibited (Uozumi *et al.*, 2000).

In precursor lesions of cervical cancer, there are no reports about the expression of S100A4. It is known that this protein is normally expressed in cells and fibroblasts of the tissue stroma (Jin *et al.*, 2012), but is still not known how the expression would occur before the basal membrane rupture with

stromal invasion, as well as the interaction with HPV virus and the resultant expression of oncoproteins. The identification of a biomarker in early lesions will allow better diagnosis and cervical cancer development and progression monitoring. This is the first paper to evaluate the S100A4 protein expression profile in cervical intraepithelial lesions samples of low and high grade, as well as cytological samples considered negative for intraepithelial lesion or malignancy, and the influence of HPV, regarding the possibility of S100A4 to act as a biomarker of injury and tumor progression.

## **METHODOLOGY**

### ***Samples***

Cervical samples of 37 patients were collected during the routine Pap Test in the city of Carazinho/RS. The samples were obtained by ecto/endocervical collection, arranged in two distinct slides and fixed in 96% ethanol for further analysis: a conventional slide for Papanicolaou staining and other silanized slide for the immunocytochemical technique. Alongside, samples were collected with ecto/endocervical brush, which were placed in specific transport medium, collection in liquid medium commercial kit (DigeneDNAwithPAP® - DNA Collection Device - hc2 HPV and CT/GC DNA Tests, USA) for subsequent DNA extraction and molecular analysis of HPV.

### **Ethics**

The research was approved by the Research Ethics Committee of UFRGS (562.824) and patients were included in the study after voluntarily sign the Informed Consent.

### ***Cell lines***

For technique standardization and S100A4 expression control, were used five different cell lines. The immortalized human keratinocytes (HaCaT) and fibroblasts (MRC-5) lines were used as non-tumor control, once their expression pattern have already been described in previous studies (Li *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2012). Squamous and gland cervical carcinoma cells lines, SiHa and HeLa respectively, were used as positive controls of protein expression, also according to results previously reported (Oloumi *et al.*, 2002; Orre *et al.*, 2013). As a standard for reduced protein expression, breast cancer cell line (MCF-7) was used (Nikitenko *et al.*, 2000).

The cell lines were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and cultured with DMEM medium (DulbecoGibco®) low glucose, supplemented with 10% fetal bovine serum, except for MRC-5 fibroblasts cell line and HaCaT, which was cultured with DMEM medium (Dulbeco Gibco®) high glucose supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were arranged on circular coverslips in 24-well plates in triplicate, and when they reached 80% confluence, they were fixed with 4% paraformaldehyde.

### ***Conventional cytology***

The slides were stained according to Papanicolaou staining as described in the literature (Engler, 2012). With optical microscopy analysis, possible cell changes were evaluated, which were interpreted according to Bethesda System 2001 (Solomon, 2005), by three independent cytologists, considering the inter-observer correlation coefficient (k). The samples were classified as: Negative for intraepithelial lesion or malignancy (including samples considered Within Normal Limits (WNL) and reactive/inflammatory benign cellular alterations); and samples with abnormal cytology as atypical morphology or injury (encompassing Atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL), Atypical squamous cells – cannot exclude HSIL (ASC-H), High-grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) and invasive squamous cell carcinoma).

### ***Molecular analysis and HPV detection***

Samples obtained from ecto/endocervical gynecological brush were stored in a specific liquid medium and refrigerated at 2 to 8°C until use. DNA extraction of samples was performed using the commercial kit *Qiamap DNA Mini Kit* (Qiagen®, Hilden/Germany), according to manufacturer's guidelines. After purification, the obtained DNA was quantified and stored at -20°C for further analysis.

As an internal control and quality assurance of DNA extraction, the constitutive gene  $\beta$ -actin was amplified for all samples. PCR was performed on predetermined conditions and the annealing temperature used was 55°C. The PCR product was analyzed on agarose gel (1.5%) stained with GelRed®, where the presence of the 104 bp fragment which identified the presence of the specific gene was verified (Brugè *et al.*, 2011).

The qualitative test for HPV detection was performed by conventional PCR technique as described by Shen-Gunther and Yu (2011)<sup>27</sup> using the primers MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') and MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'). This reaction allows the simultaneous detection of low and high risk HPV by amplification of the L1 gene in these groups, but does not identify the different HPV types in the sample. The reaction was performed in a final volume of 25 $\mu$ L, containing extracted DNA (1 $\mu$ L), Taq DNA polymerase 500U (0,25 $\mu$ L) phosphate deoxyribonucleotide 1 mM (dNTP's) (2 $\mu$ L), HPV primer mix 10mM (1 $\mu$ L), buffer 10x (2,5 $\mu$ L) and magnesium chloride (MgCl) (1 $\mu$ L). The reaction conditions were set: initial denaturation (1min-95°C); 35 cycles of amplification (1min-94°C, 1min-60°C, 1min-72°C); final extension (10min-72°C). The obtained 450bp fragment was analyzed by electrophoresis in agarose gel (1.5%) stained with GelRed® and qualitatively expressed as detectable (positive) or undetectable (negative) in the sample (Shen-Gunther e Yu, 2011). As positive control were used samples previously identified as positive for HPV by direct DNA sequencing technique.

### ***S100A4 protein expression - Immunocytochemistry***

For immunocytochemistry analysis of S100A4, were performed successive washes with distilled water and buffer saline (PBS), the silanized slides were incubated in citrate buffer and then in 5% hydrogen peroxide, reagent Background Sniper and subsequently with the primary antibody Polyclonal Rabbit Anti-Human S100A4 (DAKO Cytomation Denmark A/S®), diluted 1:1000 in PBS,

incubated overnight in a humidified, dark and refrigerated at 4°C chamber. By incubation with biotinylated secondary antibody and peroxidase enzyme (Biocare Medical). The slides were incubated with staining revealing of Betazoid Diaminobenzidin (DAB) Chromogen. Then, the hydration of the samples with distilled water, counter-stain of the nuclei with Harris hematoxylin, ammonia and increasing concentrations of alcohol, and clarification with xylene were made. The methodology was adapted from Matheus, *et al* (2012) (Matheus *et al.*, 2014).

In addition, a negative control for the technique was performed, in triplicate, in which each of the cell lines used was incubated only with PBS, without the primary antibody. The same occurred in the cervical smears slides which were divided into two regions, one for a negative technique control without addition of primary antibody (anti-S100A4) and the other with addition of primary antibody, for S100A4 expression analysis.

Finally, the slides were assembled with Canada Balsam and coverslips, observed in optical microscopy and the brown color intensity in the cytoplasm cells was evaluated. The immunocytochemistry analysis was performed semiquantitatively by two independent operators, considering the interobserver correlation coefficient (k), and the displayed fields were photographed and classified according to the intensity of expression, as: (-) absent expression, (+) weak expression, (++) moderate expression, (+++) intense expression, with a total of 100 cells per patient. The mean expression of the S100A4 protein was calculated by counting 100 cells in 10 fields randomly photographed, checking the percentage of cells found in the different S100A4 labeling intensities, and the weighted average was subsequently calculated and expressed as labeling index (LI).

To evaluate the results of the S100A4 expression analysis, samples were divided into groups according to the cytological diagnosis, as described below: A) 14 patients with negative cytological diagnosis for intraepithelial lesion or malignancy, considered within normal limits (WNL); B) 11 patients with negative cytological diagnosis for intraepithelial lesion or malignancy, considered with reactive/inflammatory benign cellular alterations (RI); C) 12 patients with cytological diagnosis with atypical morphology and/or intraepithelial lesions (ASC-US, LSIL, HSIL and ASC-H).

### **Statistical Analysis**

To perform the statistical analyzes of the study variables the Software *PASW Statistics 18/SPSS (Statistical Package for Social Sciences)* was used. The degree of interobserver agreement for both analysis, for S100A4 expression as for cytological diagnosis was calculated using Cohen's kappa test (k), which ranges from 0 to 1, where  $k > 0.8$ : excellent;  $k = 0.6-0.8$ : good;  $k = 0.4-0.6$ : regular;  $k < 0.4$ : bad (Utizg *et al.*, 2007). The qualitative variables were described as mean and standard deviation and to evaluate the relationship between the S100A4 expression, cytological diagnosis and the presence of HPV, analysis of variance (One Way ANOVA) was used, followed by Tukey test based on the comparison between qualitative variables and the weighted average of labeling. All  $p < 0.05$  results were considered significant.

## RESULTS

### ***Cytological Analysis Conventional***

The cytological diagnosis was made by three independent cytologists and the correlation coefficient between the results was considered excellent ( $k = 0.860$ ). Among the 37 samples analyzed, 25 (67.57%) had cytological diagnosis negative for intraepithelial lesion or malignancy, of which 14 (56%) were considered WNL and other 11 (44%) showed reactive or inflammatory benign cytological alterations (RI). Among the 12 (32.43%) remaining samples, diagnosed with abnormal cytology, 5 (41.67%) had ASC-US, 4 (33.33%) were classified as LSIL, 1 (8.33%) sample showed ASC-H and 2 (16.67%) were classified as HSIL.

### ***HPV detection***

All samples included in the study were positive for the  $\beta$ -actin gene, confirming the quality of DNA extraction. Among the 37 samples taken, 27 (72.98%) were positive for HPV high and/or low risk, of which 15 (55.56%) were classified by cytology as negative for intraepithelial lesion or malignancy (encompassing WNL and RI) and 12 (44.44%) had atypical morphology or cytological lesions (including ASC-US, LSIL, HSIL or ASC-H). In the other 10 (27.02%) samples there was no HPV detection.

Table 1 shows the results of HPV presence according to the cytological findings and the mean age of patients. Overall, the average age was presented between  $31 \pm 11$  years, being the minimum age 15 and the maximum 59 years.

### ***S100A4 protein expression - Immunocytochemistry***

The immunocytochemical technique was standardized for cervical smear samples by comparing the level of protein expression in cell lines of keratinocytes, cervical cancer, fibroblast and breast cancer, HaCaT<sup>14</sup>, SiHa<sup>12</sup> and HeLa<sup>22</sup> cells, MRC-5<sup>20</sup> and MCF-7<sup>23</sup> respectively, which are reported in the literature for presenting different degrees of S100A4 expression. Immunocytochemical analysis was performed by two independent observers and the correlation coefficient between the results was considered good ( $k = 0.643$ ). The S100A4 labeling was heterogeneous, with variation in staining intensity between the control cell lines. The cervical cancer cell lines SiHa and HeLa cells, and also fibroblast MRC-5 showed expression moderate to intense; however, in the keratinocytes cell line (HaCaT) cytoplasmic expression was reduced, being classified as weak to moderate. MCF-7 cell line showed low expression, which was classified as weak or absent (Figures 1 and 2).

Among the cervical samples analyzed, the expression of S100A4 had a constant variation according to the maturation degree of the stratified squamous epithelium cells (Figure 3), being lower the expression of superficial cells compared to the deep and intermediate cells (basal and parabasal), which are more immature ( $p < 0.05$ ).

When compared with other parameters evaluated in the samples, it was observed that the expression of S100A4 protein varies according to the cytological diagnosis, showing intense labeling in the presence of reactive/inflammatory benign cell alterations, compared to the samples diagnosed within normal limits ( $p < 0.05$ ). There was also a statistically significant difference regarding the samples diagnosed with cytological lesions. In these samples - which showed characteristic cytopathic effects of HPV, and which presence was confirmed by PCR - the labeling intensity was reduced when compared with samples considered reactive benign cytological changes ( $p < 0.05$ ) (Figures 4 and 5).

Therefore, as shown in Figures 4 and 5, the analysis of results showed that the group of samples diagnosed with reactive benign cytological alterations, presented increased labeling intensity that was statistically significant when compared to S100A4 expression, compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). There was also a statistically significant difference in the samples with HPV detected, which had reduced S100A4 expression ( $p < 0.0001$ ), as shown in Table 2.

This expression pattern only occurred when HPV showed clear cytopathic effect, causing injury to epithelial cells, once in samples classified by cytology as negative for intraepithelial lesion or malignancy in which there was molecular detection of HPV, the expression profile found in smear cells by immunocytochemical technique was similar to that found in samples with the same cytological diagnosis, but with no virus detection.

## DISCUSSION

In this study, we used samples from cervical scrapes obtained from both normal epithelium and those with inflammatory alterations or intraepithelial lesions and atypical morphology, to assess the S100A4 expression profile. Our results showed a variation in the labeling intensity of the protein according to different parameters. As demonstrated here for the first time, a relevant aspect from these analyzes, is that the expression of S100A4 can be identified in normal stratified squamous epithelium cells, varying according to the maturation degree of the cervical epithelium, the presence of inflammation and the cytopathic effects caused by the presence of HPV.

Regarding to labeling intensity of cells in different maturation degrees of stratified squamous epithelium, we observed that the basal or immature cells have higher expression of S100A4, since this is reduced with increasing maturation of the epithelium, with less expression in superficial or mature cells. It is believed that this occurs due to the large capacity of cell proliferation and division of immature epithelial cells, which is associated with the expression of S100A4 (Wang *et al.*, 2015). Increased expression of this protein in the samples presenting benign reactive inflammatory alterations may be associated with the fact that this protein is involved in inflammation process, corroborating data from literature (Sedaghat e Notopoulos, 2008).

The S100A4 is physiologically expressed in certain cells and tissues, especially by its involvement in processes of cell division and differentiation (Uozumi *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). The high expression of S100A4 in samples of normal epithelium, stroma

and fibroblasts of these tissues, has been described in previous studies(Li *et al.*, 2009) and are consistent with the findings of our study. However, these same authors have demonstrated that the expression of the protein presented reversely to the progression of the studied tumor type, being absent in the invasive epidermal carcinoma tissue. The same study(Li *et al.*, 2009), reported the presence of S100A4 in immortalized human keratinocytes and in benign tumor tissues cell lines. They also reported that S100A4 protein expression may be associated with DNA methylation status, once that normal tissue samples that express S100A4 showed lower degree of DNA methylation and with tumor progression the DNA is methylated, consequently the S100A4 expression is inhibited in epidermal carcinoma. In normal epidermis and in the majority of cancers DNA hypomethylation and increased expression of S100A4 in the cells occurs. However in skin cancer the opposite is observed with DNA hypermethylation and subsequent silencing of the S100A4 protein expression (Li *et al.*, 2009).

It is known that there is a strict relationship between cancer and epigenetic, where DNA hypomethylation may be involved in tumor progression, and that the consequent increase in S100A4 expression has already been described in colon cancer(Feinberg e Tycko, 2004). The methylation profile is involved in cervical carcinogenesis, where hypomethylation occurs progressively in dysplastic lesions and cancer cells compared to non-tumor control(Capoa *et al.*, 2003). The expression of HPV oncoproteins is also stimulated by hypomethylation, and hypermethylation causes transcription repression when the virus is integrated to the DNA. In invasive cervical cancer, a hypomethylated DNA pattern is described in the literature, while samples with asymptomatic infection and precursor lesions have a hypermethylated profile, demonstrating the important role of epigenetics in the life cycle of HPV(Badal *et al.*, 2003).

Within the group of samples with precursor lesions in our study, we observed a reduced expression of S100A4 in those samples in which we detected the presence of cytopathic alterations caused by HPV. We therefore suggest that the DNA hypermethylation occurs resulting from the molecular properties of the virus, which causes the lack of expression of S100A4. That is, an epigenetic process associated with methylation and degradation of tumor suppressor proteins, such as p53, can be occurring, as well as silencing the S100A4 expression. In the group with HPV detection and absence of characteristic cytopathic alterations likely to cytological diagnosis, the S100A4 expression was similar to the negative group for intraepithelial lesion or malignancy without detection of HPV, demonstrating the possible relationship between cytological abnormalities caused by active HPV infection with reduced expression of S100A4.

In the studied cell lines, we observed that cervical cancer cells HeLa and SiHa showed increased S100A4 expression, compared to the group of patients with precursor lesions of cervical cancer with HPV. Such cell lines are considered positive for HPV, however, are immature and immortalized cervical carcinoma cells, which show aggressive growth in culture and can be presented in varying degrees of changes in squamous and glandular carcinoma, SiHa and HeLa cells respectively. For being carcinoma cells and not precursor lesions, it is believed that the virus DNA is



integrated with the cell DNA, and already played its mechanisms for cervical cancer development, and also that these cells acquire different characteristics after stromal invasion and consequently another S100A4 expression profile.

Regarding the expression profile of S100A4 in cervical cancer, data in the literature are limited. A high expression of S100A4 was described in lymphocytes and fibroblasts from tissue stroma, and tumor cells of squamous cervical carcinoma showed weak and focal expression of this protein (Jin *et al.*, 2012). However, we need to move forward in understanding the expression pattern of the protein in cases of carcinoma with stromal invasion, because it is not known exactly if there is increased S100A4 expression in tumor cells or if its presence is related to the invasion of the basal membrane, where there abundant extracellular expression in fibroblasts and tissue stroma. Therefore, it is important to highlight that the identification of S100A4 profile expression in samples of precursor lesions may help the diagnosis, together with cytology and molecular analyzes in the investigation of cervical cancer.

Our study had some limitations that hampered the possibility of contributing even more to understand the role and S100A4 expression profile in cervical specimens. The first limiting factor has been the absence of squamous cell carcinoma samples for the immunocytochemistry technique. It is known that the incidence of cervical cancer cases is decreasing, mainly due to screening and prevention campaigns, so that injuries and cytological abnormalities are detected at an early stage, allowing adequate treatment and intervention, as well as vaccination against HPV, contributing to reduce high-risk oncogenic HPV infection, associated with tumor progression. A purposeful sample selection in gynecological clinics with women in screening programs did not provide collection of samples in extremely advanced stages of carcinogenesis. The expression analysis of results was performed by two observers also considered a limitation, because it is a random field analysis with subtle differences between the various degrees of labeling.

The expansion of this work in tumor biopsy samples will allow a broader analysis of the results. We also consider that our sample could be expanded as well as follow-up collections of each patient, which would enable confirmatory studies, especially regarding the methylation profile found in cases of precursor lesions. Thus, there is the prospect of further evaluation, particularly involving epigenetic and precursor lesions, so that we can establish the role of S100A4 as a prognostic marker of cervical cancer.

Therefore, the actual function of S100A4 in cervical carcinogenesis has not yet been fully elucidated, and may be other mechanisms associated with hypomethylation and epigenetic which leads to the expression of HPV oncoproteins after integration into the host DNA, and increased S100A4 expression, which seems to play similar roles in tumor progression, mainly interacting with the tumor suppressor protein, p53.

In summary, we analysed the S100A4 expression profile in samples of precursor lesions of cervical cancer. We found that this protein is expressed in normal squamous epithelium and its expression has variation in the different degrees of epithelium maturation, in the presence of

inflammatory disorders, as well as lesions in samples with HPV cytopathic effects. Therefore, it can be inferred that the S100A4 expression assessment may help in the early diagnosis of cervical cancer in cervical intraepithelial lesions positive for HPV.

#### **FUNDING SUPPORT**

The authors wish to thank CNPq, PPGCF/UFRGS and PROPESq Brazilian agencies for the financial support.

#### **CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no conflicts of interest to perform this research.

**REFERENCES**

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*. 127(12):2893-2917, 2010.
2. Schiffman M, Solomon D. Cervical-Cancer Screening with Human Papillomavirus and Cytologic Cotesting. *The New England journal of medicine*. 369(24):2324-2331, 2013;
3. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. *BioMed research international*. 2013; 2013.
4. Gross SR, Sin CGT, Barraclough R, Rudland PS. Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. *Cellular and molecular life sciences*. 71(9):1551-1579, 2014.
5. Wang D, Zhang J, Liu Z, et al. Functional expression, characterization and application of the human S100A4 protein. *Molecular medicine reports*. 11(1):175-181 2015.
6. Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia*. 12(4):198, 2008.
7. Donato R, Cannon B, Sorci G, et al. Functions of S100 proteins. *Current molecular medicine*. 13(1):24, 2013.
8. Matsuzaki S, Darcha C. Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. *Human reproduction*, 2012.
9. Ghoual A, Serova M, Astorgues-Xerri L, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and resistance to ingenol 3-angelate, a novel protein kinase C modulator, in colon cancer cells. *Cancer research*. 69(10):4260-4269, 2009.
10. Cao W, Liu H, Liu X, et al. Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by upregulation of S100A4/MMPs signaling. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 17(5):609-617, 2013.

11. Tian X, Wang Q, Li Y, et al. The Expression of S100A4 Protein in Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Clinicopathologic Significance and Prognostic Value. *Pathology & Oncology Research*. 2014.
12. Orre L, Panizza E, Kaminsky V, et al. S100A4 interacts with p53 in the nucleus and promotes p53 degradation. *Oncogene*. 32(49):5531-5540, 2013.
13. Boye K, Mælandsmo GM. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *The American journal of pathology*. 176(2):528-535, 2010.
14. Li Y, Liu ZL, Zhang KL, et al. Methylation-associated silencing of S100A4 expression in human epidermal cancers. *Experimental dermatology*. 18(10):842-848, 2009.
15. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 15(2):96-109, 2015.
16. Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, et al. Tumor Suppressor p53 Protein Is a New Target for the Metastasis-associated Mts1/S100A4 Protein FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF THEIR INTERACTION. *Journal of Biological Chemistry*. 276(25):22699-22708, 2001.
17. Horiuchi A, Hayashi T, Kikuchi N, et al. Hypoxia upregulates ovarian cancer invasiveness via the binding of HIF-1 $\alpha$  to a hypoxia-induced, methylation-free hypoxia response element of S100A4 gene. *International journal of cancer*. 131(8):1755-1767, 2012.
18. Xie R, Loose DS, Shipley GL, Xie S, Bassett RL, Broaddus RR. Hypomethylation-induced expression of S100A4 in endometrial carcinoma. *Modern Pathology*. 2007;20(10):1045-1054.
19. Chong HI, Lee JH, Yoon MS, et al. Prognostic value of cytoplasmic expression of S100A4 protein in endometrial carcinoma. *Oncology reports*. 31(6):2701-2707, 2014.
20. Jin L, Shen Q, Ding S, Jiang W, Jiang L, Zhu X. Immunohistochemical expression of Annexin A2 and S100A proteins in patients with bulky stage IB–IIA cervical cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Gynecologic oncology*. 126(1):140-146, 2012.
21. Uozumi M, Murao S, Katayama N, Kitazawa S, Amatsu M, Maeda S. Induction of S100A4 gene expression inhibits in vitro invasiveness of human squamous cell carcinoma, KOSC-3 cells. *Cancer letters*. 149(1):135-141, 2000.

22. Oloumi A, Lam W, Banath J, Olive P. Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *International journal of radiation biology*. 78(6):483-492, 2002.
23. Nikitenko LL, Lloyd BH, Rudland PS, Fear S, Barraclough R. Localisation by in situ hybridisation of S100A4 (p9Ka) mRNA in primary human breast tumour specimens. *International journal of cancer*. 86(2):219-228, 2000.
24. Engler MELCSSM. Técnicas de Processamento e Rastreamento dos Esfregaços Citológicos Cérvico Vaginais. In: Roca, ed. *Citologia Clínica Cérvico-vaginal*, 2012.
25. Solomon DN, Ritu. *Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal*. Vol -. Segunda ed. Rio de Janeiro, 2005.
26. Brugè F, Venditti E, Tiano L, Littarru G, Damiani E. Reference gene validation for qPCR on normoxia-and hypoxia-cultured human dermal fibroblasts exposed to UVA: is  $\beta$ -actin a reliable normalizer for photoaging studies? *Journal of biotechnology*. 156(3):153-162, 2011.
27. Shen-Gunther J, Yu X. HPV molecular assays: defining analytical and clinical performance characteristics for cervical cytology specimens. *Gynecologic oncology*. 123(2):263-271, 2011.
28. Matheus ER, Zonta MA, Discacciati MG, et al. MMP-9 expression increases according to the grade of squamous intraepithelial lesion in cervical smears. *Diagnostic cytopathology*. 2014.
29. Utizg RdAV, Lucas CAP, Dalla Corte EA, Vargas VRA. *Análise da Concordância Interobservadores em Exames de Papanicolaou*. 2007.
30. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*. 4(2):143-153, 2004.
31. Capoa D, Rosa D, Nonno D, Donnorso P. DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. *Oncology reports*. 10(3):545-549, 2003.
32. Badal V, Chuang LS, Tan EH-H, et al. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *Journal of virology*. 77(11):6227-6234, 2003.

**Table 1:** Group characteristics of women in the study

Cytological Alterations	Cytological Analysis	Number of Samples (%)	Average Age (years)	HPV Positivity (%)
NO	WNL	14 (56)	30±7	15 (55,56)
	RI	11 (44)	38±11	
YES	ASC-US	5 (41,67)	28±10	12 (44,44)
	LSIL	4 (33,33)	31±15	
	ASC-H	1 (8,33)	25±0	
	HSIL	2 (16,67)	26±5	

WNL: Within Normal Limits; RI: Reativecytology/inflammatory changes; ASCUS: Atypical squamous cells of undetermined significance; LSIL: Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion; ASCH: Atypical squamous cells – cannot exclude HSIL; HSIL: High-grade Squamous Intraepithelial Lesion.

**Table 2:** S100A4 protein labeling index compared to cytological diagnosis and HPV detection.

Variable	S100A4expression (LI)	Statistics (p)
<b>Cytology</b>		p<0,05
WNL	132,07	
RI	158,55	
Atypical/Lesion	122,42	
<b>HPV</b>		p<0,0001
Negative	188,67	
Positive	123,50	

WNL: Within Normal Limits; RI: Reativecytology/inflammatory changes

## Figure captions

**Figure 1.** S100A4 protein expression by immunocytochemistry, analyzed by optical microscopy (400x) in control cell lines: (A) HaCaT, with cytoplasmic labeling considered weak to moderate, distributed heterogeneously; (B) MCF-7, with weak or absent cytoplasmic labeling; (C) HeLa, with cytoplasmic labeling moderate to intense; (D) SiHa, showing intense nuclear and cytoplasmic labeling; (E) MRC-5, exhibiting moderate staining in both the cytoplasm and nucleus.

**Figure 2.** Representative graph of the S100A4 protein labeling index (LI) by immunocytochemistry, presented by cell lines studied, analyzed by optical microscopy (400x).

**Figure 3.** Expression of S100A4 protein by immunocytochemistry, analyzed by optical microscopy (400x) in stratified squamous epithelial cells of the ectocervix, in varying degrees of maturation: (A) Basal squamous cell (arrow), showing intense cytoplasmic labeling; (B) Parabasal squamous cell with moderate to intense labeling; (C) Intermediate squamous cell with moderate cytoplasmic labeling; (D) Superficial squamous cell, with weak or absent labeling.

**Figure 4.** S100A4 protein expression by immunocytochemistry, analyzed by optical microscopy (400x) in cervical smears from research participants. Represent cells with different patterns of S100A4 protein expression, according to the cytological diagnosis: (A) Within the normal limits; (B) Reactive/inflammatory benign cellular alterations; (C) Low-grade squamous intraepithelial lesion/LSIL with HPV; (D) High-grade squamous intraepithelial lesion/HSIL with HPV.

**Figure 5.** Representative graph of S100A4 protein labeling index (LI) by immunocytochemistry in different groups according to the cytological diagnosis. Group A: Within normal limits; Group B: reactive/ inflammatory benign cellular alterations; Group C: Atypical/cytological lesions (ASC-US/LSIL/ASC-H/HSIL).

Figure 1

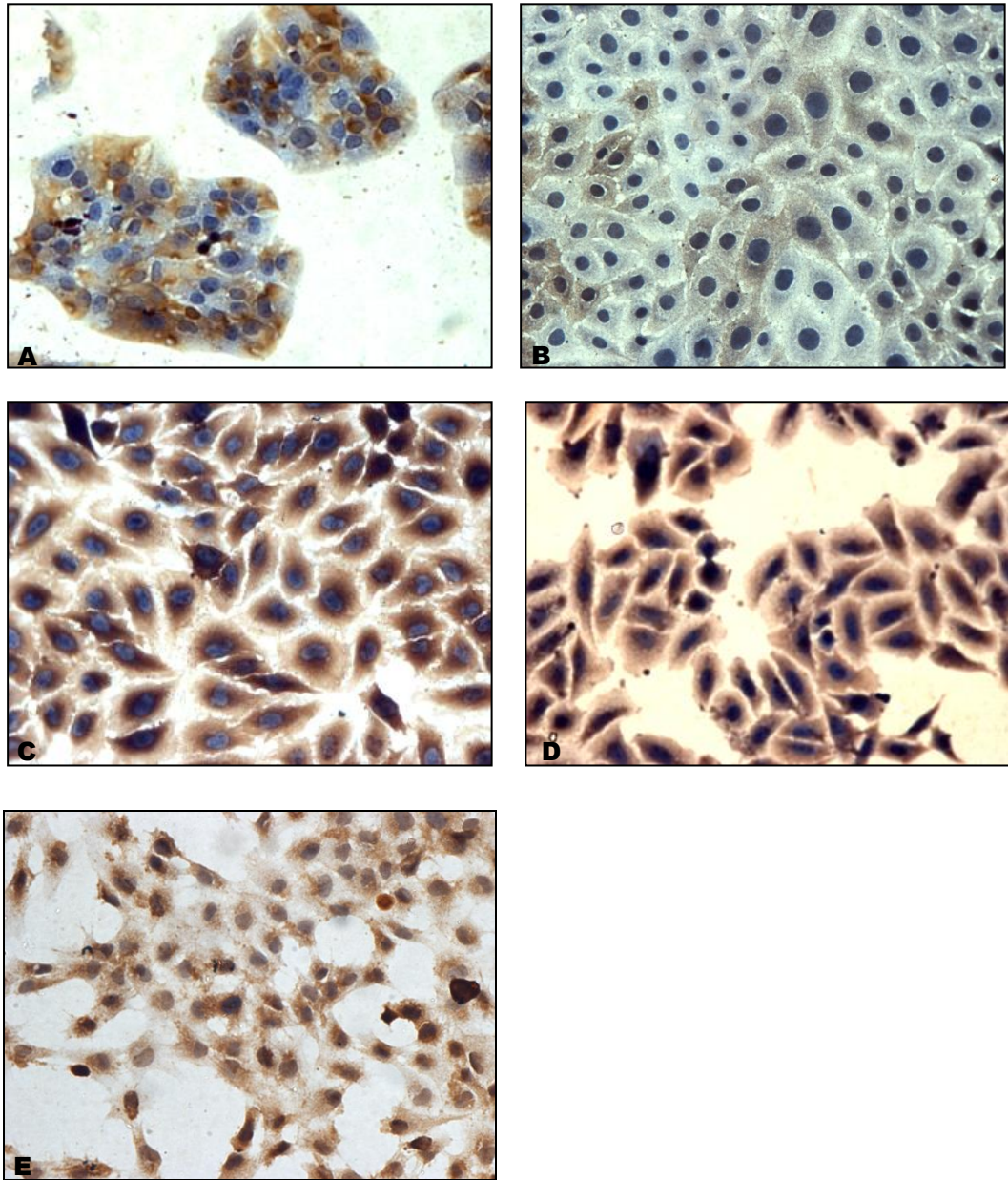




Figure 2

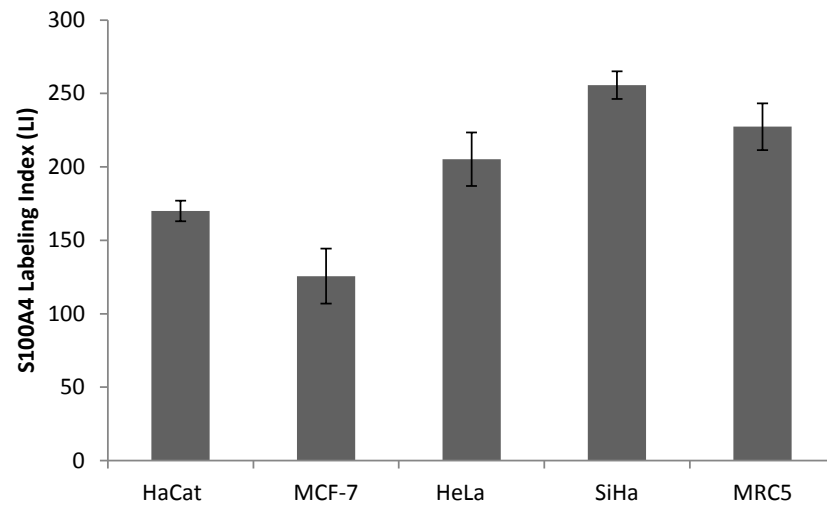


Figure 3

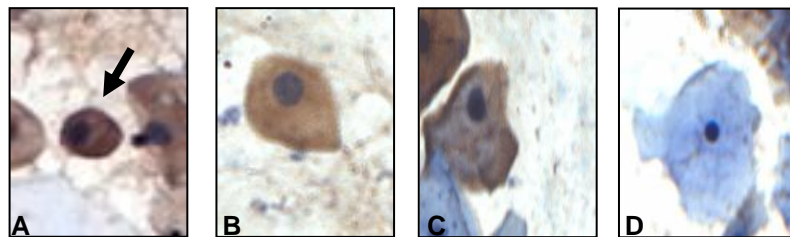


Figure 4

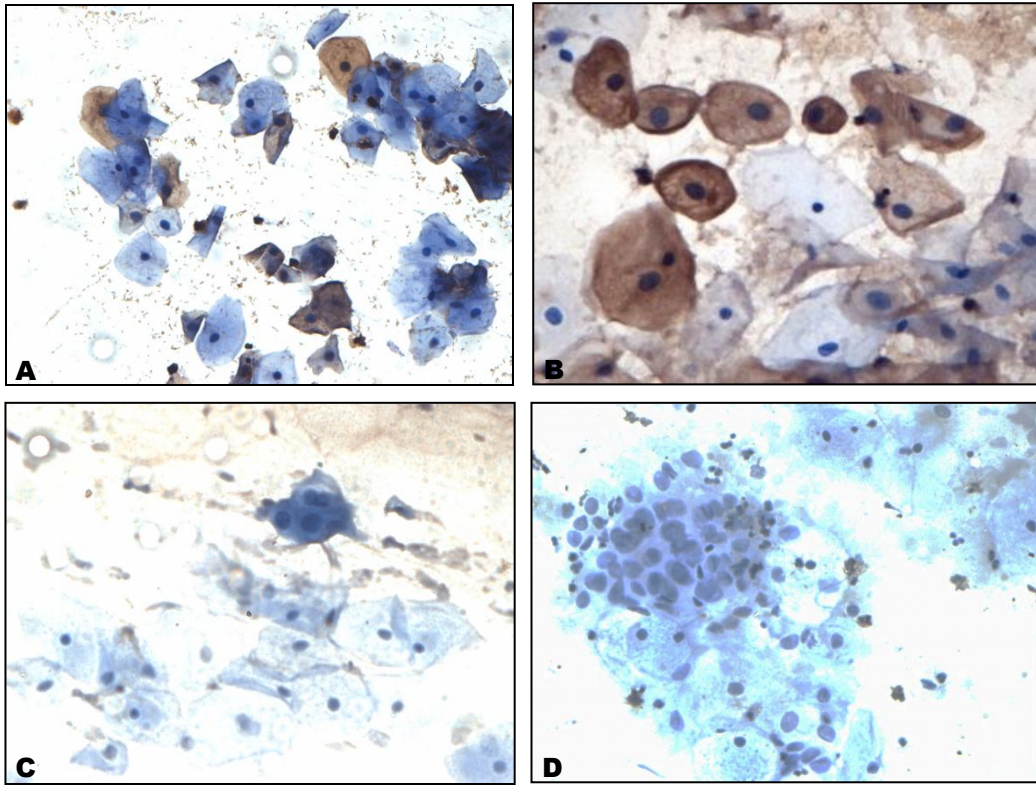
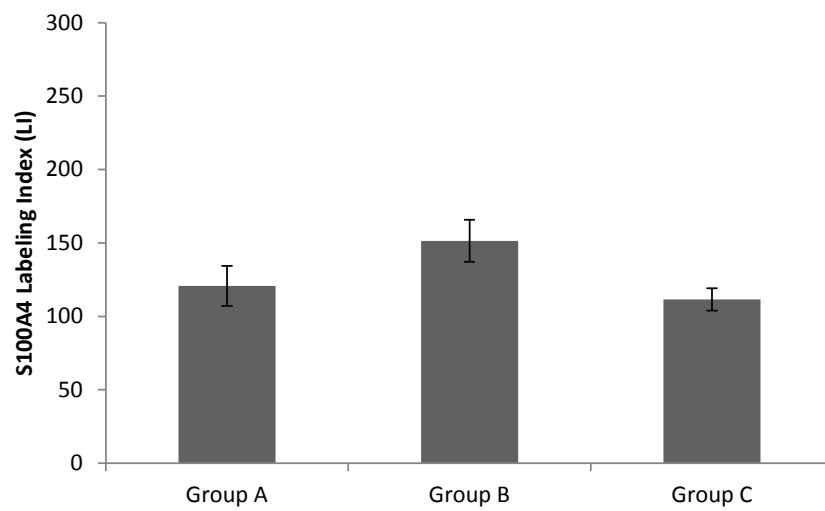


Figure 5



#### **IV. Discussão Geral**

---



Considerado ainda um importante problema de saúde pública, o câncer cervical acomete mulheres de diversas faixas etárias e condições sociais, em diferentes regiões do mundo (Organization, 2013; Inca, 2014). Apresenta como principal fator etiológico a infecção pelo HPV, o qual é um agente etiológico transmitido sexualmente e possui estrita relação com o desenvolvimento de suas lesões precursoras. Assim sendo, este tipo de neoplasia está entre as poucas com possibilidade de prevenção, por meio da identificação precoce das lesões intraepiteliais e detecção do HPV (Schiffman e Solomon, 2013; Uyar e Rader, 2014).

A simples infecção pelo HPV não é suficiente para que haja progressão tumoral, já que outros fatores podem estar envolvidos. Características socioambientais ou exógenas incluindo contraceptivos hormonais, fumo e paridade, condições socioeconômicas e fatores relacionados à resposta imune do hospedeiro e, principalmente, a presença de infecções podem contribuir para a entrada e persistência do vírus e, conseqüentemente, para a progressão tumoral (Rodrigues *et al.*, 2009).

A avaliação citológica é empregada no rastreamento de lesões precursoras e tem reduzido as taxas de morbimortalidade por CC. Esta técnica é utilizada na identificação de alterações celulares decorrentes da infecção pelo HPV e das lesões precursoras do CC, sendo considerada bastante sensível e específica, quando realizada por profissional devidamente especializado e treinado. Também desempenha importante papel no diagnóstico de inflamações e infecções do trato genital feminino (Og *et al.*, 2010; Kashyap e Bhambhani, 2011). Entretanto, sua sensibilidade é restrita com relação à detecção e à identificação dos agentes infecciosos presentes, bem como à interpretação subjetiva dos resultados (Do Carmo e Fiorini, 2007; Bringhenti, 2010). Novas metodologias estão sendo utilizadas em associação à citologia, permitindo o acompanhamento clínico e terapêutico com um diagnóstico mais sensível dos agentes infecciosos relacionados à carcinogênese. Entre as principais técnicas moleculares empregadas estão a Captura Híbrida, a Hibridização *in situ* e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Do Carmo e Fiorini, 2007; Bringhenti, 2010). Outro aspecto importante dentro deste

contexto é a constante busca por biomarcadores que possam indicar a presença de lesões ou mesmo estejam associados à presença dos agentes infecciosos.

Desta maneira, nesta dissertação procuramos abordar todos os aspectos mencionados anteriormente, em busca de uma melhor estratégia de rastreamento de lesões, agentes infecciosos e potenciais biomarcadores relacionados às lesões precursoras da carcinogênese cervical. Os resultados foram organizados na forma de 3 artigos científicos com abordagens específicas.

No primeiro artigo científico elaborado, visando avaliar a relação entre o diagnóstico citológico e os diferentes agentes relacionados à carcinogênese cervical, foi possível identificar nas amostras de pacientes obtidas em coleta preventiva de rotina que a maioria apresentou diagnóstico citológico negativo para lesão intraepitelial ou malignidade, variando entre achados dentro dos limites da normalidade e alterações benignas reativas ou inflamatórias. Em uma menor parte das pacientes houve a detecção de atipias e alterações citológicas. Os hábitos comportamentais como sedentarismo e tabagismo apresentaram associação com as alterações citológicas inflamatórias e atipias, respectivamente. Estes dados demonstram a influência destes fatores no desenvolvimento das lesões, sendo que existem evidências na literatura indicando que o desenvolvimento do CC é estreitamente relacionado ao tabagismo, estabelecendo-se uma relação dose-dependente com número de cigarros fumados por dia (Inca, 2014; Kaderli *et al.*, 2014).

Todas as pacientes diagnosticadas com lesão ou atipias, e mesmo algumas com diagnóstico negativo para lesão intraepitelial ou malignidade, apresentaram positividade para o HPV, apresentando uma prevalência de cerca de 20%. Dentre as pacientes com diagnóstico citológico considerado negativo para lesão intraepitelial ou malignidade, 11,25% apresentaram positividade para HPV, das quais, 5,96% estavam dentro dos limites da normalidade e 5,29% apresentaram alterações inflamatórias benignas reativas. Levantamento realizado por De Sanjosé *et al.* (2007), demonstrou uma prevalência semelhante em amostras de pacientes com citologia normal, distribuídas em diferentes regiões do mundo. Este dado ressalta a importância da detecção precoce da presença do HPV antes que o mesmo provoque

alterações citológicas, permitindo um melhor acompanhamento destas. Sabe-se que a infecção pelo HPV pode ocorrer de forma clínica, subclínica ou ainda latente, caracterizando-se, respectivamente, pela presença de lesões verrucosas, alterações citológicas, colposcópicas ou histopatológicas e identificação molecular sem alterações morfológicas (Do Carmo e Fiorini, 2007; Abreu *et al.*, 2012). Portanto, a detecção de HPV em amostras de pacientes com citologia normal deve ser avaliada com cautela juntamente com outros parâmetros como imunidade da pacientes e fatores virais, principalmente relacionados ao genótipo do HPV presente, sendo de extrema relevância o acompanhamento citológico periódico (Wright *et al.*, 2015).

É importante destacar também que a frequência de infecção pelo HPV diminui consideravelmente ao longo da idade da mulher, sendo mais prevalente em mulheres jovens, quando as células cervicais estão em constante replicação e o microambiente cervical está mais propenso à infecção viral (Murta *et al.*, 2001; Inca, 2014). Em nosso trabalho, identificamos que a presença de alterações citológicas e a detecção de HPV foram mais frequentes na faixa etária entre 21 e 30 anos, o que corrobora com estudo realizado anteriormente que encontrou maior prevalência de infecção por HPV em mulheres com idade inferior a 35 anos e redução com o aumento da idade (Pinheiro *et al.*, 2013). Este fator pode ser considerado favorável para as pacientes, visto que existem relatos de que em adultos jovens com idade inferior a 30 anos a infecção pelo HPV tem maior probabilidade de regredir espontaneamente e não evoluir para o CC, o que não é frequente em pessoas acima dos 30 anos, nas quais a infecção normalmente torna-se persistente (Inca, 2014).

O desenvolvimento de lesões precursoras e do CC está estritamente relacionado à infecção persistente por genótipos de HPV de alto risco. Estes infectam as células imaturas do epitélio de maneira persistente, as quais estão em constante replicação, facilitando a integração, multiplicação e proliferação viral, fazendo com que as lesões progridam. Os genótipos de HPV de alto risco encontrados com maior frequência nos casos de carcinoma relatados na literatura são HPV 16, 18, 31, 33, 39 e 45 (Munoz, 2000; Kraus *et al.*, 2006; Parkin *et al.*, 2008; Barcellos *et al.*, 2011). Alguns estudos demonstram que os genótipos 58, 52,

35, 59, 51 e 56 também possam contribuir para o CC (Pinheiro *et al.*, 2013). No entanto, a região geográfica é considerada determinante na prevalência dos diferentes genótipos do HPV circulantes (Coser *et al.*, 2013). Em função desta prevalência, e considerando os genótipos mais frequentes em nossa região, selecionamos os genótipos do HPV 16, 18, 31, 33, 39 e 45 para caracterização a partir das amostras triadas positivamente para HPV.

Sabe-se que os genótipos do HPV 16 e 18 são encontrados com maior prevalência nos casos de câncer de colo de útero (Munoz *et al.*, 2006; Entiauspe *et al.*, 2010). Nossos resultados indicam que o genótipo 39 foi mais prevalente, corroborando com estudo realizado por Munoz (2000), que demonstrou que este genótipo é comumente encontrado na América latina. Um levantamento realizado por Bruno (2014), também indicou este genótipo como um dos mais prevalentes no Brasil. Destaca-se que, considerando a baixa prevalência de casos de lesão de alto grau em nossas amostras, outros tipos diferentes do HPV 16 e 18 podem apresentar frequências mais representativas.

Entretanto, mesmo com o aspecto de normalidade de nossas amostras, o genótipo do HPV 16 apresentou-se prevalente, concordando com a maioria dos estudos desta natureza (Entiauspe *et al.*, 2010). Este é considerado o principal genótipo encontrado dos casos de carcinoma escamoso mundialmente, tanto é que está presente nas principais vacinas desenvolvidas para prevenção do câncer de colo de útero (Munoz *et al.*, 2006; Oliveira-Silva *et al.*, 2011). Já o genótipo HPV 18 foi identificado somente nos casos de infecção simultânea com outros tipos virais e não apresentou prevalência considerável, confirmando os dados apresentados por Bruno (2014) no qual este genótipo também apresentou baixa prevalência. Acredita-se que isso ocorra devido ao fato que este genótipo possa estar associado à presença de lesões glandulares e adenocarcinomas, sendo pouco frequente nos casos de lesões intraepiteliais e carcinoma escamoso (Batista *et al.*, 2014) e nossas amostras não apresentaram nenhum caso representativo deste tipo de lesão.

Relacionando a presença de diferentes genótipos de HPV e a idade das pacientes, observou-se que a prevalência, tanto de infecções simples como de infecções por múltiplos genótipos de alto risco oncogênico, são mais prevalentes em



mulheres com idade entre 21 e 30 anos. O genótipo do HPV 39 foi mais prevalente em uma faixa etária um pouco mais ampla, entre 21 e 40 anos. O genótipo do HPV 45 não apresentou uma prevalência alta, no entanto, dentre as três amostras identificadas, 66,66% apresentaram idade superior a 50 anos. Este dado deve ser ressaltado para que haja melhor acompanhamento destas pacientes, pois além da influência da faixa etária na persistência da infecção deste genótipo, está associado a tumores mais agressivos, diagnosticados, em média, quatro anos antes do que os causados por outros genótipos de HPV de alto risco oncogênico (Pinheiro *et al.*, 2013).

O genoma dos HPV considerados de alto risco oncogênico possuem oncoproteínas que, quando expressas, contribuem para a persistência da infecção viral e progressão tumoral. Entre essas oncoproteínas, estão as conhecidas E6 e E7 dos genótipos do HPV 16 e 18, as quais são responsáveis pela inativação de genes supressores tumorais, permitindo a proliferação e integração do DNA viral no hospedeiro (Hellner *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 2014). Para avaliar a capacidade do vírus em atuar na progressão tumoral, a análise da expressão das oncoproteínas é considerada relevante, no entanto, para que isso ocorra, é necessária avaliação molecular por meio de ácido ribonucleico (RNA), sendo que esse foi um fator limitante na realização do presente estudo. Devido à baixa qualidade e quantidade da extração de RNA em nossas amostras coletadas em meio de transporte, realizou-se apenas a confirmação qualitativa (DNA) da presença das oncoproteínas. Ambas foram detectadas em todas as amostras, confirmando sua presença no genoma do HPV 16 e 18 o que, conseqüentemente, contribui para ampliar o potencial carcinogênico desses genótipos (Consolaro, 2012).

Com relação à estratégia adotada para a triagem de HPV, utilizou-se a amplificação da região conservada L1. Estudos referem que a alternativa é altamente sensível, sendo considerada adequada para detecção dos 40 diferentes genótipos de HPV genitais com maior importância clínica (Tjalma e Depuydt, 2013; Şahiner *et al.*, 2014). As amostras identificadas como positivas na primeira reação foram novamente amplificadas na reação de hibridização através dos *primers* GP5+/6+. Dentre as amostras triadas para HPV pelos *primers* MY09/11, somente

5,71% não apresentaram positividade para os genótipos de HPV de alto risco oncogênico pesquisados com GP5+/GP6+, comprovando a eficácia na detecção. Estas amostras podem ser consideradas positivas para HPV de baixo risco oncogênico ou positivas para outros genótipos de HPV de alto risco que não os presentes nas sondas pesquisadas. O baixo número discordante entre as duas reações demonstra que os genótipos escolhidos para a composição do painel de identificação estão de acordo com aqueles mais prevalentes para esta população.

Considerando evidências de que os diferentes agentes etiológicos das doenças sexualmente transmissíveis promovam processos inflamatórios e microtraumas no epitélio cervical e facilitam a infecção, inoculação e integração do DNA do HPV (Entiauspe *et al.*, 2010), a identificação destes microrganismos possibilita um diagnóstico mais efetivo, acompanhamento e melhor prognóstico das pacientes. Dentre os agentes causadores de DSTs, os mais frequentes em associação à infecção pelo HPV e progressão tumoral, estão a *Chlamydia trachomatis*, *Herpes simplex virus 1 e 2*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* e *Treponema pallidum* (Muvunyi *et al.*, 2011). A detecção desses microrganismos por amplificação de ácidos nucleicos é considerada mais sensível que a microscopia convencional ou métodos de cultura (Schmitt *et al.*, 2014).

A *Chlamydia trachomatis*, considerada uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns atualmente, possui importante papel na evolução da infecção pelo HPV. Acredita-se que o processo inflamatório e as lesões causadas pela infecção persistente de *Chlamydia trachomatis* no epitélio uterino contribuam para a entrada do vírus HPV (Da Silva Barros *et al.*, 2012). A infecção pela *C. trachomatis* ocorre em células endocervicais ou escamosas imaturas e promove a transformação do epitélio cervical, denominada metaplasia escamosa, favorecendo a inoculação viral. O HPV apresenta predileção pelo epitélio metaplásico, pois estas células estão em constante replicação, permitindo sua rápida proliferação e multiplicação e conseqüentemente, o desenvolvimento de neoplasia caso não ocorra o tratamento adequado destas lesões (Urbina *et al.*, 2010; Deluca *et al.*, 2011). Nossos resultados indicam que a infecção por *C. trachomatis* foi bastante prevalente e a maioria das pacientes em que este agente foi detectado não apresentou

sintomas, o que é uma das características desta infecção, contribuindo para inflamação crônica. Apesar dos poucos casos de coinfeção por *C. trachomatis* e HPV, houve associação da presença de *C. trachomatis* tanto na infecção isolada como por múltiplos genótipos de HPV de alto risco oncogênico, confirmando seu envolvimento no desenvolvimento do carcinoma cervical.

A presença dos demais microrganismos foi relativamente baixa e não foram encontradas associações significativas. Sendo assim, a inclusão da pesquisa desses outros microrganismos nos programas de rastreamento deve ser avaliada com cautela. Acredita-se que seria indicada apenas para aquelas pacientes que apresentassem histórico de infecção, sintomas ou fatores predisponentes. Quanto à infecção por *Trichomonas vaginalis*, que é considerado o agente etiológico não viral mais comum das doenças sexualmente transmissíveis (Powell *et al.*, 2006), a prevalência foi baixa comparada a outros estudos (Muvunyi *et al.*, 2011). No entanto, durante análise citológica, foi possível identificar em uma amostra alterações inflamatórias reativas características da presença de *T.vaginalis*, como redução da flora de lactobacilos e aumento da flora mista, apagamento de bordas citoplasmáticas, halos perinucleares, pseudoeosinofilia, leucocitose, binucleação, cariomegalia, citoplasma cianofílico, em meio a um fundo de esfregaço sujo, inflamatório e com leucocitose. Verificou-se também a presença de grânulos citoplasmáticos eosinofílicos e a presença de estruturas em formato piriforme, com núcleo pálido, excêntrico e oval, a qual foi confirmada molecularmente como positiva para *T. vaginalis*.

A presença do *Herpes simplex virus*, tanto do tipo 1 como do tipo 2 nas pacientes, demonstrou que existe a infecção genital pelo HSV 2, a qual está relacionada às mudanças nas práticas sexuais, como já citado por Al-Daraji e Smith (2009), já que inicialmente somente o HSV tipo 1 era considerado agente etiológico de DSTs. Há relatos na literatura que indicam que a infecção por Herpes vírus contribui para a carcinogênese cervical, atuando sinergicamente com o HPV. As lesões herpéticas ulcerativas facilitam o acesso do HPV na camada basal do epitélio e a resposta inflamatória induzida pelo vírus pode suprimir o sistema imunológico para outras infecções. A infecção viral também pode provocar danos no DNA do

hospedeiro, acelerando a replicação e aumentando a integração das sequências do DNA do HPV (Al-Daraji e Smith, 2009). Portanto, quando detectado, é importante que haja um melhor acompanhamento da paciente visando a prevenção da infecção pelo HPV e do câncer de colo do útero.

A infecção por *Mycoplasma genitalium* foi pouco frequente nas pacientes avaliadas, corroborando com estudos anteriores (Muvunyi *et al.*, 2011). É descrito em uma taxa de prevalência que pode variar de 0 a 47%, sendo multifatorial e dependente da população envolvida. Em grupos de baixo risco, a prevalência encontrada é semelhante a encontrada em nosso estudo. Esses autores relatam ainda a presença de infecção simultânea por *C. trachomatis* e *M. genitalium*, o que também se confirmou em alguns casos que observamos (Daley *et al.*, 2014).

O *Treponema pallidum* e a *Neisseria gonorrhoeae*, agentes etiológicos das doenças sexualmente transmissíveis Sífilis e Gonorreia, respectivamente, se apresentaram pouco frequentes comparados a estudo realizado anteriormente (Souza *et al.*, 2013). Ambos os microrganismos possuem diagnóstico considerado relativamente subjetivo, no entanto, a PCR está se tornando um importante método para detecção precoce das infecções (Liu *et al.*, 2001). Mesmo com esta estratégia, não foram detectadas de maneira significativa, refletindo o perfil da amostra analisada em nosso trabalho e o resultado de políticas públicas voltadas para sua erradicação.

Analisando-se globalmente, nas amostras em que houve a detecção de algum agente etiológico de DSTs, a maioria apresentou diagnóstico citológico negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (DLN/RI), exceto na detecção de HPV, a qual foi mais prevalente naquelas pacientes com diagnóstico de atipias ou lesões intraepiteliais. Quanto à sintomatologia, grande parte das pacientes que relatou algum tipo de sintoma como secreção vaginal ou prurido apresentou positividade para um ou mais microrganismos dentre os pesquisados. O diagnóstico citológico com alterações celulares benignas reativas ou inflamatórias não apresentou associação com os casos que em que houve positividade na detecção molecular de um ou mais agentes etiológicos de DSTs. A maioria das pacientes apresentou características inflamatórias inespecíficas, sem detecção do agente etiológico. A

relação entre esfregaços inflamatórios e o diagnóstico de malignidade foi verificada em estudo realizado por Og *et al.* (2010) demonstrando que, quando presente, a inflamação pode ocultar alterações pré-malignas e malignas, sendo necessário o tratamento do processo inflamatório para um diagnóstico citológico adequado. Desta forma reforça-se a estratégia da pesquisa molecular de HPV em amostras submetidas à investigação citológica, bem como de *C. trachomatis*, visto sua associação com genótipos de alto risco do vírus.

Os processos inflamatórios no epitélio cérvico-vaginal também podem estar associados à infecção por leveduras do gênero *Candida* sp., a qual é encontrada em cerca de 25% das mulheres com infecção por HPV (Murta *et al.*, 2001; Solomon, 2005; Martins *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2008). No segundo artigo científico apresentado, propomos avaliar a correlação entre o diagnóstico citológico e a presença de diferentes espécies de *Candida* sp. potencialmente patogênicas, determinando o perfil de susceptibilidade dos isolados frente aos antifúngicos convencionalmente prescritos na clínica médica ginecológica.

Observou-se que a espécie isolada com maior frequência foi *C. albicans*, seguida de *C. glabrata* e poucos isolados de *C. krusei*, corroborando com dados publicados anteriormente por Marchaim *et al.* (2012) e Zhang *et al.* (2014), que demonstram que a espécie mais frequente envolvida nos casos de candidíase vulvovaginal é a *C. albicans*. No entanto, a ocorrência de espécies “*não-albicans*” está aumentando consideravelmente, adquirindo significado clínico, principalmente por apresentarem, na maioria das vezes, elevadas taxas de resistência a terapias antifúngicas, dificultando o tratamento (Dharmik *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Rangunathan *et al.*, 2014; Udayalaxmi e D’souza, 2014).

Com relação à sintomatologia, a maioria das pacientes analisadas não apresentou sintomas característicos da infecção por *Candida* sp., como secreção vaginal e prurido. Dentre aquelas pacientes sintomáticas, 50% apresentaram cultura positiva, sendo que houve associação entre a presença de sintomatologia com a cultura micológica positiva para *C. albicans*, espécie isolada com maior prevalência. Em alguns casos, as pacientes assintomáticas também apresentaram positividade em cultura com a *C. albicans* sendo, da mesma forma, a espécie mais prevalente,

demonstrando que pode estar presente tanto na infecção sintomática quanto assintomática (Ragunathan *et al.*, 2014).

Observou-se também a presença de alterações inflamatórias em 14,20% dos casos de cultura positiva para o gênero, sendo que somente 5,3% foram detectadas através do teste de Papanicolaou, demonstrando que a cultura para *Candida* sp. é um método muito mais sensível. Nos casos onde há suspeita clínica de candidíase, a cultura é considerada padrão ouro para o diagnóstico, não podendo ser substituída pelo teste de Papanicolaou. No entanto, não é recomendada como avaliação inicial devido ao seu custo mais elevado, maior tempo para o diagnóstico final e presença de falso-positivo, decorrente da colonização assintomática (Feuerschuetz *et al.*, 2010).

Devido à ampla variedade de antifúngicos e os diversos padrões de susceptibilidade das diferentes espécies de *Candida*, torna-se necessário a realização de testes de susceptibilidade aos antifúngicos para que a conduta clínica seja efetiva (Ragunathan *et al.*, 2014). Foi possível observar que, tanto nas pacientes sintomáticas como nas assintomáticas, o antifúngico considerado mais eficaz foi a Anidulafungina. Este antifúngico possui atividade antifúngica excelente, no entanto, sua terapia se restringe a casos mais graves, como candidíases sistêmicas ou em casos em que há infecção por espécies com baixa sensibilidade aos demais antifúngicos existentes, portanto deve ser utilizado com cautela. A Anfotericina B, antifúngico que possui alta eficácia, mas elevada toxicidade, também apresentou ação sobre os isolados, mas em maiores concentrações. Quanto ao Fluconazol, amplamente empregado nos casos de candidíase vulvovaginal, grande parte dos isolados da presente pesquisa apresentou perfil resistente. Este dado é extremamente importante, considerando o amplo emprego do Fluconazol na rotina de tratamento da candidíase. Recomenda-se, portanto, realizar a avaliação do perfil de sensibilidade antes do início da conduta terapêutica, padrão semelhante ao empregado para a utilização de antibioticoterapia frente a agentes bacterianos, já que chama a atenção a alta frequência de resistência nestes isolados.

A presença de inflamação e infecções por microrganismos resistentes e persistentes no trato genital feminino contribuem para a inoculação do HPV e,

conseqüentemente, a integração do DNA viral no hospedeiro. O HPV provoca lesões no epitélio cervical que resultam em transformações na função gênica e expressão de proteínas (Schiffman e Solomon, 2013; Tornesello *et al.*, 2013). Tendo em vista esse panorama, o terceiro artigo científico foi desenvolvido com a intenção de investigar o papel da proteína S100A4 como possível biomarcador da evolução das lesões precursoras do câncer de colo do útero. Esta proteína é descrita na literatura por estar envolvida em processos de diferenciação e proliferação celular, inflamação e metástase (Li *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). Para tanto, foi avaliado por meio de análise imunocitoquímica o perfil de expressão da proteína S100A4 em amostras de lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau, bem como em amostras citológicas consideradas negativas para lesão intraepitelial ou malignidade e a influência da presença do HPV nestas amostras.

Nas amostras cervicais avaliadas, foi possível verificar que o perfil de marcação da proteína S100A4 se apresentou de maneira heterogênea, com variação na intensidade de marcação da proteína de acordo com os diferentes parâmetros analisados. Os esfregaços cervicais analisados foram divididos em 3 grupos, de acordo com o diagnóstico citológico, como dentro dos limites da normalidade, alterações citológicas benignas reativas ou inflamatórias, e atípicas ou lesões citológicas. Foi possível observar, pela primeira vez, que a expressão da proteína S100A4 pode ser identificada nas células normais do epitélio escamoso estratificado, variando em função do grau de maturação do epitélio cervical, da presença de inflamação e de lesões com efeitos citopáticos causados pela presença do HPV.

Com relação à intensidade de marcação da proteína S100A4 nos diferentes graus de maturação das células do epitélio escamoso estratificado, considerado citologicamente dentro dos limites da normalidade, observou-se que as células superficiais apresentam menor marcação da proteína S100A4 e esta expressão aumenta inversamente em relação à maturação do epitélio, sendo maior nas células intermediárias e profundas. Acredita-se que isto ocorra em decorrência da capacidade de proliferação e diferenciação das células mais imaturas, o que está relacionado às funções da proteína S100A4 (Wang *et al.*, 2015). Nas células de

amostras com diagnóstico citológico de alterações benignas reativas ou inflamatórias, observou-se aumento da marcação da proteína, fato possivelmente associado com o envolvimento da S100A4 nos processos de inflamação, como descrito anteriormente (Sedaghat e Notopoulos, 2008). Nas amostras de atipias e lesões intraepiteliais com efeitos citopáticos do HPV houve redução da marcação da proteína S100A4, a qual se apresentou de forma inversa à progressão do grau das lesões, com menor expressão nos casos de lesão intraepitelial de alto grau.

O mecanismo envolvido com a redução da expressão da proteína nos casos com lesão intraepitelial positiva para HPV ainda não está elucidado. Alguns estudos demonstram associação de processos epigenéticos com alterações nos níveis de expressão da proteína S100A4 em outros tipos de carcinoma. A inibição da expressão foi demonstrada em consequência da metilação no DNA, em amostras de epiderme (Li *et al.*, 2009). Acredita-se que possa existir uma relação entre a integração do HPV no DNA do hospedeiro e um mecanismo de metilação, durante a progressão das lesões precursoras do câncer de colo do útero.

Estudo publicado recentemente a respeito do envolvimento da S100A4 no câncer demonstra que existe a expressão fisiológica da proteína em alguns tecidos normais, como no caso do epitélio mamário (Bresnick *et al.*, 2015) e de epiderme normal (Li *et al.*, 2009). Nos casos de carcinoma cervical, são poucos os dados existentes, entretanto, estudo realizado por Jin *et al.* (2012), demonstrou que existe expressão fraca e focal nas células tumorais e esta expressão é elevada nas células do estroma, linfócitos e fibroblastos teciduais. Acredita-se que a expressão da S100A4 no estroma possa contribuir para progressão tumoral e disseminação metastática (Bresnick *et al.*, 2015).

Como em nosso trabalho foram avaliados casos de lesões precursoras, o padrão de expressão da proteína S100A4 em esfregaços de carcinoma cervical é desconhecido. A relação entre a invasão do estroma e aumento da expressão da S100A4 pode ocorrer e deve ser investigada futuramente. Portanto, uma hipótese provável seria a existência de expressão fisiológica da proteína S100A4 no epitélio normal, a qual é inibida por mecanismos moleculares do vírus HPV no



desenvolvimento das lesões precursoras e, quando ocorre o rompimento da membrana basal com invasão do estroma tecidual, há o aumento da sua expressão.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos evidenciam que diversos fatores estão associados e favorecem o desenvolvimento de lesões precursoras e, prospectivamente, do CC. Verificou-se que a presença de agentes etiológicos de doenças sexualmente transmissíveis provoca alterações no epitélio cervical e inflamação que facilitam a infecção e persistência do HPV. Além disso, o processo inflamatório decorrente também apresentou associação com a expressão da proteína S100A4, sugerindo, embora ainda de forma preliminar, sua possibilidade de uso como biomarcador da evolução das lesões intraepiteliais. Devido à importância do câncer cervical em nossa população, somente através da adoção de estratégias complementares como as propostas aqui descritas será possível identificá-lo precocemente, intervir e, por consequência, reduzir suas taxas de prevalência e morbimortalidade.



## **V. Conclusões Gerais**

---



Os resultados apresentados nesta dissertação permitem as seguintes conclusões:

1. Hábitos comportamentais como tabagismo, sedentarismo e presença de sintomas como secreção vaginal e prurido foram associados ao diagnóstico citológico com alterações celulares benignas reativas. A presença de atipias citológicas também foi mais prevalente em pacientes tabagistas;
2. O diagnóstico citológico negativo para lesão intraepitelial ou malignidade foi o mais prevalente nesta população, sendo que destes, em grande parte houve a detecção de alterações celulares benignas reativas ou inflamatórias;
3. O aparecimento de lesões ou atipias citológicas apresentou associação com a presença de HPV, tanto na infecção simples como na infecção por múltiplos genótipos considerados de alto risco oncogênico, sendo que o genótipo detectado com maior prevalência na população estudada foi o genótipo do HPV 39, seguido do HPV 16 e do HPV 31. Neste sentido, destaca-se a indicação da pesquisa molecular do HPV complementar à citologia, bem como sua genotipagem considerando os tipos mais prevalentes em nosso meio;
4. A presença do HPV também foi detectada em pacientes com diagnóstico negativo para lesão intraepitelial ou malignidade, sendo considerada infecção latente, a qual deve ser acompanhada com exames citológicos periódicos;
5. A presença de outros agentes infecciosos foi detectada na população estudada, sendo que a *Chlamydia trachomatis* foi bastante prevalente, apresentando associação com a infecção com um genótipo de HPV assim como múltiplos genótipos de alto risco oncogênico. Desta forma, há indicação de que a bactéria seja investigada, principalmente por desempenhar importante papel como cofator do carcinoma cervical;
6. As alterações citológicas benignas reativas ou inflamatórias muitas vezes são inespecíficas. Na maioria das pacientes com este diagnóstico citológico não foi detectado nenhum agente etiológico de DSTs. A simples presença deste achado ao exame citológico não fornece indicação da pesquisa de múltiplos

agentes infecciosos, a qual deve ser associada com outros fatores, como histórico de infecção e sintomas;

7. Nos casos de candidíase, tanto nas pacientes sintomáticas como nas assintomáticas, a espécie mais prevalente foi a *Candida albicans*, seguida de *Candida glabrata* e *Candida krusei*, porém a detecção de *Candida albicans* deve ser interpretada em conjunto com a sintomatologia da paciente, pois existe a possibilidade de colonização assintomática.
8. As espécies de *Candida* sp. isoladas da população, na maioria dos casos apresentaram perfil resistente ao antifúngico Fluconazol. A Anidulafungina e a Anfotericina B apresentaram-se eficazes para o tratamento dos isolados, em diferentes concentrações. Este dado indica para a importância da realização do perfil de sensibilidade, principalmente para terapia com Fluconazol;
9. Existe relação entre a expressão da proteína S100A4 e as alterações citológicas características do HPV. Os diferentes graus de lesões intraepiteliais com efeitos citopáticos do HPV apresentaram associação com a redução da expressão da proteína S100A4;
10. A expressão fisiológica da proteína S100A4 no epitélio escamoso estratificado da ectocérvice varia de acordo com o grau de maturação do epitélio;
11. A presença de diagnóstico com alterações citológicas benignas reativas ou inflamatórias se relacionou com o aumento da expressão da proteína S100A4;
12. A avaliação da expressão da proteína S100A4 pode auxiliar no diagnóstico precoce do câncer de colo do útero nas lesões intraepiteliais cervicais positivas para HPV.







Diante dos resultados encontrados e visando o aprofundamento e melhor entendimento das relações estabelecidas, são propostas algumas perspectivas:

1. De maneira geral, aumentar o número amostral a partir de amostras com lesões de alto grau e carcinoma escamoso;
2. Desenvolver e aprimorar técnicas de extração de RNA de amostras com baixa celularidade, visando verificar a expressão das oncoproteínas virais E2, E6, e E7 dos genótipos do HPV 16 e HPV 18 em amostras cervicais através da PCR em tempo real;
3. Avaliar o perfil de metilação de DNA em amostras positivas para HPV de lesões precursoras de câncer de colo do útero;
4. Confirmar a identificação da espécie das leveduras por meio da técnica de Espectroscopia em Infravermelho como possibilidade de introdução e otimização de uma metodologia ainda pouco utilizada em laboratórios clínicos;
5. Avaliar o perfil de expressão da proteína S100A4 de amostras de esfregaços cervicais com carcinoma escamoso;
6. Correlacionar o perfil de expressão da proteína S100A4 encontrado com análises imunohistoquímicas de amostras de tecidos normais, com características inflamatórias ou diferentes graus de carcinoma cervical.
7. Avaliar a aplicabilidade de softwares de imagem para reduzir a variação interobservador na interpretação imunocitoquímica, considerando a introdução desta metodologia em programas de triagem em larga escala;



## VII. Referências

---



ABREU, A. et al. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. **Viol J**, v. 9, p. 262, 2012.

AL-DARAJI, W. I.; SMITH, J. H. Infection and cervical neoplasia: facts and fiction. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 2, n. 1, p. 48, 2009.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 5, p. 319-27, 2007.

AMARO-FILHO, S. M. et al. A comparative analysis of clinical and molecular factors with the stage of cervical cancer in a brazilian cohort. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e57810, 2013. ISSN 1932-6203.

ARAUJO, C. R. D. et al. Identificação das leveduras do gênero Candida por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMagar (TM) Candida. **Rev. patol. trop**, v. 34, n. 1, p. 37-42, 2005. ISSN 0301-0406.

ARAÚJO, S. R. Carcinomas, Atipias e Lesões Precursoras -Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL). In: DILIVROS (Ed.). **Citologia Cevicvaginal**. 2ª, 2012. p.119-169.

BADAL, V. et al. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. **Journal of virology**, v. 77, n. 11, p. 6227-6234, 2003. ISSN 0022-538X.

BARCELLOS, R. B. et al. Evaluation of a novel microplate colorimetric hybridization genotyping assay for human papillomavirus. **Journal of virological methods**, v. 177, n. 1, p. 38-43, 2011. ISSN 0166-0934.

BATISTA, J. E. et al. FATORES ASSOCIADOS AO VÍRUS HPV E LESÕES CERVICAIS EM MULHERES QUILOMBOLAS/FACTORS ASSOCIATED WITH HPV VIRUS AND CERVICAL LESIONS IN QUILOMBOLA WOMEN. **Revista de Pesquisa em Saúde**, v. 15, n. 1, 2014. ISSN 2236-6288.

BOATTO, H. F. et al. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos

parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 29, n. 2, p. 80-84, 2007.

BOYE, K.; MÆLANDSMO, G. M. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. **The American journal of pathology**, v. 176, n. 2, p. 528-535, 2010. ISSN 0002-9440.

BRESNICK, A. R.; WEBER, D. J.; ZIMMER, D. B. S100 proteins in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 2, p. 96-109, 2015. ISSN 1474-175X.

BRINGHENTI, M. E. Z. E. A. Prevenção do câncer cervical: associação da citologia oncológica a novas técnicas de biologia molecular na detecção do papilomavírus humano (HPV). **DST-J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n. 3, p. 135-140, 2010. ISSN 0103-4065.

BRUGÈ, F. et al. Reference gene validation for qPCR on normoxia-and hypoxia-cultured human dermal fibroblasts exposed to UVA: is  $\beta$ -actin a reliable normalizer for photoaging studies? **Journal of biotechnology**, v. 156, n. 3, p. 153-162, 2011. ISSN 0168-1656.

BRUNO, A. Distribuição dos genótipos de papilomavírus humano em mulheres do estado da Bahia, Brasil. **CEP**, v. 40170, p. 070, 2014.

CAMPOS, A. C. C. et al. Prevalence of vulvovaginitis and bacterial vaginosis in patients with koilocytosis. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 126, n. 6, p. 333-336, 2008. ISSN 1516-3180.

CAO, W. et al. Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by upregulation of S100A4/MMPs signaling. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 17, n. 5, p. 609-617, 2013.

CAPOA, D. et al. DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. **Oncology reports**, v. 10, n. 3, p. 545-549, 2003. ISSN 1021-335X.

CENTURION-LARA, A. et al. Multiple Alleles of Treponema pallidum Repeat Gene D in Treponema pallidum Isolates. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 8, p. 2332-2335, 2000. ISSN 0021-9193.

CHONG, H. I. et al. Prognostic value of cytoplasmic expression of S100A4 protein in endometrial carcinoma. **Oncology reports**, v. 31, n. 6, p. 2701-2707, 2014. ISSN 1021-335X.

CIAPPONI, A. et al. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25493, 2011. ISSN 1932-6203.

CONSOLARO, M. E. L. et al. Correlation of Candida species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. **Rev Iberoam Micol**, v. 21, n. 4, p. 202-5, 2004.

CONSOLARO, M. E. L. E., SILVYA MARIA STUCHI. . Biologia do HPV. In: ROCA (Ed.). **Citologia Clínica Cérvico-Vaginal - Texto e Atlas**, 2012. p.288. ISBN 978-85-4120-024-0.

CORNETTA, M. D. C. D. M.; GONÇALVES, A. K. D. S.; BERTINI, A. M. Efficacy of cytology for the diagnosis of Chlamydia trachomatis in pregnant women. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 337-340, 2006. ISSN 1413-8670.

CORRÊA, P. D. R. et al. Phenotypic characterization of yeasts isolated from the vaginal mucosa of adult women. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 4, p. 177-181, 2009. ISSN 0100-7203.

COSER, J. et al. Prevalence and genotypic diversity of cervical human papillomavirus infection among women from an urban center in Brazil. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 4, p. 4276-4285, 2013.

DA SILVA BARROS, N. K. et al. Association of HPV infection and Chlamydia trachomatis seropositivity in cases of cervical neoplasia in Midwest Brazil. **Journal of medical virology**, v. 84, n. 7, p. 1143-1150, 2012. ISSN 1096-9071.

DA SILVA, T. G. T.; DOS SANTOS, R.; STINGHEN, A. E. Biomarcadores em lesões do colo uterino. **RBAC**, v. 42, n. 3, p. 161-164, 2010.

DALAZEN, D. et al. Comparison of susceptibility profile among clinical isolates of oral and vulvovaginal Candida spp. in southern Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011. ISSN 1676-2444.

DALBEN-DOTA, K. F. et al. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 16, n. 3, p. 285-290, 2010. ISSN 1075-5535.

DALEY, G. et al. Mycoplasma genitalium: a review. **International journal of STD & AIDS**, v. 25, n. 7, p. 475-487, 2014. ISSN 0956-4624.

DE SANJOSÉ, S. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 7, p. 453-459, 2007. ISSN 1473-3099.

DELUCA, G. D. et al. Chlamydia trachomatis as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 567-572, 2011. ISSN 1413-8670.

DEMITTO, F. D. O. et al. Antifungal susceptibility of Candida spp. in vitro among patients from Regional University Hospital of Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, p. 315-322, 2012. ISSN 1676-2444.

DHARMIK, P. G.; GOMASHE, A.; UPADHYAY, V. Susceptibility Pattern of Various Azoles Against Candida Species Causing Vulvovaginal Candidiasis. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v. 63, n. 2, p. 135-137, 2013. ISSN 0971-9202.

DO CARMO, E. F. S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 1, 2007. ISSN 1980-0002.

DONATO, R. et al. Functions of S100 proteins. **Current molecular medicine**, v. 13, n. 1, p. 24, 2013.

ENGLER, M. E. L. C. S. S. M. Técnicas de Processamento e Rastreamento dos Esfregaços Citológicos Cérvico Vaginais. In: ROCA (Ed.). **Citologia Clínica Cérvico-vaginal** 2012. cap. 3, p.31-42. ISBN 978-85-4120-024-0.

ENTIAUSPE, L. G. et al. Papilomavírus humano: prevalência e genótipos encontrados em mulheres HIV positivas e negativas, em um centro de referência no extremo Sul do Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 3, p. 260-3, 2010.



FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143-153, 2004. ISSN 1474-175X.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International journal of cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-2917, 2010. ISSN 1097-0215.

FERRAZZA, M. et al. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FEUERSCHUETTE, O. H. M. et al. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **Femina**, v. 38, n. 1, 2010. ISSN 0100-7254.

FRANCESCHI, S. et al. Cervical infection with Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in women from ten areas in four continents: a cross-sectional study. **Sexually transmitted diseases**, v. 34, n. 8, p. 563-569, 2007. ISSN 0148-5717.

GHOUL, A. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and resistance to ingenol 3-angelate, a novel protein kinase C modulator, in colon cancer cells. **Cancer research**, v. 69, n. 10, p. 4260-4269, 2009. ISSN 0008-5472.

GIMENES, F. et al. Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98862, 2014. ISSN 1932-6203.

GOMIH-ALAKIJA, A. et al. Clinical characteristics associated with Mycoplasma genitalium among female sex workers in Nairobi, Kenya. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3660-3666, 2014. ISSN 0095-1137.

GRIGORIAN, M. et al. Tumor Suppressor p53 Protein Is a New Target for the Metastasis-associated Mts1/S100A4 Protein FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF THEIR INTERACTION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22699-22708, 2001. ISSN 0021-9258.

GROSS, S. R. et al. Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 9, p. 1551-1579, 2014. ISSN 1420-682X.

HARTMANN, K. E. et al. Screening for cervical cancer. 2002.

HELLNER, K. et al. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. **Virology**, v. 391, n. 1, p. 57-63, 2009. ISSN 0042-6822.

HEYMANS, R. et al. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 2, p. 497-502, 2010. ISSN 0095-1137.

HORIUCHI, A. et al. Hypoxia upregulates ovarian cancer invasiveness via the binding of HIF-1 $\alpha$  to a hypoxia-induced, methylation-free hypoxia response element of S100A4 gene. **International journal of cancer**, v. 131, n. 8, p. 1755-1767, 2012. ISSN 1097-0215.

HUANG, M.; KAO, K. C. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. **FEMS microbiology letters**, v. 333, n. 2, p. 85-93, 2012. ISSN 1574-6968.

HYACINTH, H. I. et al. Cervical cancer and pap smear awareness and utilization of pap smear test among Federal civil servants in North Central Nigeria. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46583, 2012. ISSN 1932-6203.

INCA. Instituto Nacional do Cancer José Alencar Gomes da Silva. p. Estimativa 2014 2014. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> >.

IRION, C. I.; BUFFON, A. Avaliação da adequabilidade das amostras de exames citopatológicos realizados em um laboratório de Porto Alegre–RS no ano de 2000. **RBAC**, v. 41, n. 3, p. 217-20, 2009.

JIN, L. et al. Immunohistochemical expression of Annexin A2 and S100A proteins in patients with bulky stage IB–IIA cervical cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. **Gynecologic oncology**, v. 126, n. 1, p. 140-146, 2012. ISSN 0090-8258.

KADERLI, R.; SCHNÜRIGER, B.; BRÜGGER, L. E. The impact of smoking on HPV infection and the development of anogenital warts. **International journal of colorectal disease**, v. 29, n. 8, p. 899-908, 2014. ISSN 0179-1958.

KASHYAP, V.; BHAMBHANI, S. Incidence and Cytomorphological Peculiarities of Lower Genital Tract Infections in Vault (Post Hysterectomy) Smears Versus Pap Smears from Non-Hysterectomy Subjects: A Retrospective Study. **The Journal of**

**Obstetrics and Gynecology of India**, v. 61, n. 5, p. 558-561, 2011. ISSN 0971-9202.

KENNEDY, E. M. et al. Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. **Journal of virology**, v. 88, n. 20, p. 11965-11972, 2014. ISSN 0022-538X.

KOSS, L. G. G., CLAUDE. **Introdução à Citopatologia Ginecológica**. 1. 2006. ISBN 8572416056.

KRAUS, I. et al. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1310-1317, 2006. ISSN 0095-1137.

LAUDADIO, J. Human papillomavirus detection: testing methodologies and their clinical utility in cervical cancer screening. **Advances in anatomic pathology**, v. 20, n. 3, p. 158-167, 2013. ISSN 1072-4109.

LI, Y. et al. Methylation-associated silencing of S100A4 expression in human epidermal cancers. **Experimental dermatology**, v. 18, n. 10, p. 842-848, 2009. ISSN 1600-0625.

LIU, H. et al. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1941-1946, 2001. ISSN 0095-1137.

LIU, X. et al. Species distribution and susceptibility of *Candida* isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. 106-111, 2014. ISSN 1156-5233.

MACHADO, M. S. C. et al. Prevalence of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active adolescents from Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 188-191, 2012. ISSN 1413-8670.

MARCHAIM, D. et al. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 120, n. 6, p. 1407-1414, 2012. ISSN 0029-7844.

MARTINS, M. C. L. et al. Avaliação do método de Papanicolaou para triagem de algumas infecções cérvico-vaginais. **RBAC**, v. 39, n. 3, p. 217-221, 2007.

MARTINS, T. R. et al. CERVICAL CYTOLOGY, HPV DNA AND MRNA—A COMPARATIVE STUDY IN 162 PATIENTS. **DST-J bras Doenças Sex Transm**, v. 24, n. 2, p. 79-84, 2012. ISSN 0103-4065.

MATHEUS, E. R. et al. MMP-9 expression increases according to the grade of squamous intraepithelial lesion in cervical smears. **Diagnostic cytopathology**, 2014. ISSN 1097-0339.

MATSUZAKI, S.; DARCHA, C. Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. **Human reproduction**, p. der442, 2012. ISSN 0268-1161.

MORIARTY, A. T. et al. Performance of Candida-Fungal-Induced Atypia and Proficiency Testing: Observations From the College of American Pathologists Proficiency Testing Program. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 133, n. 8, p. 1272-1275, 2009. ISSN 1543-2165.

MUNHOZ, D. C., LAURA BEATRIZ DA SILVA; ENGLER, SILVYA STUCHI MARIA. Carcinoma Escamoso e Atipias. In: ROCA (Ed.). **Citologia Clínica Cervico-vaginal**, 2012. cap. 11, p.143-190. ISBN 978-85-4120-024-0.

MUNOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. **Journal of clinical virology**, v. 19, n. 1, p. 1-5, 2000. ISSN 1386-6532.

MUNOZ, N. et al. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S1-S10, 2006. ISSN 0264-410X.

MURTA, E. F. C. et al. Infecção pelo papilomavírus humano em adolescentes: relação com o método anticoncepcional, gravidez, fumo e achados citológicos. **Rev Bras Gineco Obstet**, v. 23, n. 4, 2001.

MUSIAL, D. C. et al. FREQUÊNCIA DE LEVEDURAS EM EXAMES COLPOCITOLÓGICOS OFERECIDOS PELO SUS EM DUAS CIDADES DO NORTE PARANAENSE. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 4, n. 2, 2009. ISSN 1980-0002.

MUVUNYI, C. M. et al. Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 71, n. 1, p. 29-37, 2011. ISSN 0732-8893.

NADEEM, S. G.; HAKIM, S. T.; KAZMI, S. U. Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of Candida species directly from clinical specimens in resource-limited settings. **Libyan Journal of Medicine**, v. 5, n. 1, 2010. ISSN 1819-6357.

NETO, J. B. D. L. Atlas de Citopatologia e Histopatologia do colo uterino. 1999. Disponível em: < <http://www.pro-celula.com.br/home/atlascitologico/> >.

NIKITENKO, L. L. et al. Localisation by in situ hybridisation of S100A4 (p9Ka) mRNA in primary human breast tumour specimens. **International journal of cancer**, v. 86, n. 2, p. 219-228, 2000. ISSN 1097-0215.

NOMELINI, R. S. et al. Prevention of cervical cancer in women with ASCUS in the Brazilian Unified National Health System: cost-effectiveness of the molecular biology method for HPV detection. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 11, p. 2043-2052, 2012. ISSN 0102-311X.

OG, A.; OE, O.; TO, A. Sensitivity of a papanicolaou smear in the diagnosis of candida albicans infection of the cervix. **North American journal of medical sciences**, v. 2, n. 2, p. 97, 2010.

OLIVEIRA-SILVA, M. et al. Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. **Virol J**, v. 8, n. 4, 2011.

OLOUMI, A. et al. Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. **International journal of radiation biology**, v. 78, n. 6, p. 483-492, 2002. ISSN 0955-3002.

ORGANIZATION, W. H. WHO guidance note: comprehensive cervical cancer prevention and control: a healthier future for girls and women. 2013. ISSN 9244505142.

ORRE, L. et al. S100A4 interacts with p53 in the nucleus and promotes p53 degradation. **Oncogene**, v. 32, n. 49, p. 5531-5540, 2013. ISSN 0950-9232.

PARKIN, D. M. et al. Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the Latin America and Caribbean region. **Vaccine**, v. 26, p. L1-L15, 2008. ISSN 0264-410X.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American journal of medicine**, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012. ISSN 0002-9343.

PINHEIRO, M. M. et al. HPV EO DESENVOLVIMENTO DE NEOPLASIAS: uma revisão integrativa de literatura. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 1, 2013. ISSN 1516-7534.

POWELL, N.; SMITH, K.; FIANDER, A. Recovery of human papillomavirus nucleic acids from liquid-based cytology media. **Journal of virological methods**, v. 137, n. 1, p. 58-62, 2006. ISSN 0166-0934.

RAGUNATHAN, L. et al. Phenotypic Characterization and Antifungal Susceptibility Pattern to Fluconazole in Candida species Isolated from Vulvovaginal Candidiasis in a Tertiary Care Hospital. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 8, n. 5, p. DC01, 2014.

RATNAM, S. The laboratory diagnosis of syphilis. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 45, 2005.

RODRIGUES, A. D. et al. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 6, p. 457-62, 2009.

RODRIGUEZ-CERDEIRA, C.; SANCHEZ-BLANCO, E.; ALBA, A. Evaluation of association between vaginal infections and high-risk human papillomavirus types in female sex workers in Spain. **ISRN obstetrics and gynecology**, v. 2012, 2012.

ŞAHINER, F. et al. Detection of major HPVs by a new multiplex real-time PCR assay using type-specific primers. **Journal of microbiological methods**, v. 97, p. 44-50, 2014. ISSN 0167-7012.

SCHIFFMAN, M.; SOLOMON, D. Cervical-Cancer Screening with Human Papillomavirus and Cytologic Cotesting. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 24, p. 2324-2331, 2013. ISSN 0028-4793.

SCHMITT, M. et al. Bead-based multiplex sexually transmitted infection profiling. **Journal of Infection**, 2014. ISSN 0163-4453.

SEDAGHAT, F.; NOTOPOULOS, A. S100 protein family and its application in clinical practice. **Hippokratia**, v. 12, n. 4, p. 198, 2008.

SHEN-GUNTHER, J.; YU, X. HPV molecular assays: defining analytical and clinical performance characteristics for cervical cytology specimens. **Gynecologic oncology**, v. 123, n. 2, p. 263-271, 2011. ISSN 0090-8258.

SHINOBU, C. S. et al. Lack of association between genotypes and virulence factors in *C. albicans* strains isolated from vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 467-471, 2007. ISSN 1517-8382.

SIQUEIRA, M. E. L. C. V. L. D. Microbiologia Cérvico-Vaginal. In: ROCA (Ed.). **Citologia Clínica Cérvico-vaginal**, 2012. cap. 6, p.73-94.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1961-1971, 2007. ISSN 0140-6736.

SOLOMON, D. N., RITU. **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal**. Segunda Rio de Janeiro: -, 2005. - ISBN 85-7309-916-X.

SOUZA, P. et al. Prevalence of *Candida* sp. in the cervical–vaginal cytology stained by Harris–Shorr. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 279, n. 5, p. 625-629, 2009. ISSN 0932-0067.

SOUZA, R. P. et al. Simultaneous Detection of Seven Sexually Transmitted Agents in Human Immunodeficiency Virus–Infected Brazilian Women by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 6, p. 1199-1202, 2013. ISSN 0002-9637.

STEVENS, M. P. et al. Comparison of the Digene Hybrid Capture 2 assay and Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY human papillomavirus (HPV) tests in detecting high-risk HPV genotypes in specimens from women with previous abnormal Pap smear results. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 7, p. 2130-2137, 2007. ISSN 0095-1137.

SVENSTRUP, H. et al. A cross-sectional study of *Mycoplasma genitalium* infection and correlates in women undergoing population-based screening or clinic-based

testing for Chlamydia infection in London. **BMJ open**, v. 4, n. 2, p. e003947, 2014. ISSN 2044-6055.

TIAN, X. et al. The Expression of S100A4 Protein in Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Clinicopathologic Significance and Prognostic Value. **Pathology & Oncology Research**, p. 1-7, 2014. ISSN 1219-4956.

TJALMA, W.; DEPUYDT, C. Cervical cancer screening: which HPV test should be used—L1 or E6/E7? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 170, n. 1, p. 45-46, 2013. ISSN 0301-2115.

TORNESELLO, M. L. et al. Viral and Cellular Biomarkers in the Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. ISSN 2314-6133.

TORTORANO, A. M. et al. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **International journal of antimicrobial agents**, v. 27, n. 5, p. 359-366, 2006. ISSN 0924-8579.

UDAYALAXMI, S. J.; D'SOUZA, D. Comparison Between Virulence Factors of Candida albicans and Non-Albicans Species of Candida Isolated from Genitourinary Tract. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 8, n. 11, p. DC15, 2014.

UOZUMI, M. et al. Induction of S100A4 gene expression inhibits in vitro invasiveness of human squamous cell carcinoma, KOSC-3 cells. **Cancer letters**, v. 149, n. 1, p. 135-141, 2000. ISSN 0304-3835.

URBINA, M. T. et al. Infección por Chlamydia trachomatis. **Rev Obstet Ginecol Venez**, v. 70, n. 2, p. 90, 2010.

UTIZG, R. D. A. V. et al. Análise da Concordância Interobservadores em Exames de Papanicolaou. 2007.

UYAR, D.; RADER, J. Genomics of Cervical Cancer and the Role of Human Papillomavirus Pathobiology. **Clinical chemistry**, v. 60, n. 1, p. 144-146, 2014. ISSN 0009-9147.

VAN DOORNUM, G. et al. Comparison between the LCx Probe System and the COBAS AMPLICOR System for Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria



gonorrhoeae Infections in Patients Attending a Clinic for Treatment of Sexually Transmitted Diseases in Amsterdam, The Netherlands. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 3, p. 829-835, 2001. ISSN 0095-1137.

WANG, D. et al. Functional expression, characterization and application of the human S100A4 protein. **Molecular medicine reports**, v. 11, n. 1, p. 175-181, 2015. ISSN 1791-2997.

WANG, J.-L. et al. Application of human papillomavirus in screening for cervical cancer and precancerous lesions. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 5, p. 2979-2982, 2013.

WEI, Q. et al. Candida albicans and bacterial vaginosis can coexist on Pap smears. **Acta cytologica**, v. 56, n. 5, p. 515-519, 2012. ISSN 1938-2650.

WHEELER, C. M. The natural history of cervical human papillomavirus infections and cervical cancer: gaps in knowledge and future horizons. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 40, n. 2, p. 165-176, 2013. ISSN 0889-8545.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007. ISSN 1474-175X.

WRIGHT, T. C. et al. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: End of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. **Gynecologic oncology**, 2015. ISSN 0090-8258.

XIE, R. et al. Hypomethylation-induced expression of S100A4 in endometrial carcinoma. **Modern Pathology**, v. 20, n. 10, p. 1045-1054, 2007. ISSN 0893-3952.

XIE, R. et al. S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF- $\beta$ 1 signaling. **Laboratory investigation**, v. 89, n. 8, p. 937-947, 2009. ISSN 0023-6837.

ZHANG, J. Y. et al. Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. **Mycoses**, v. 57, n. 10, p. 584-591, 2014. ISSN 1439-0507.

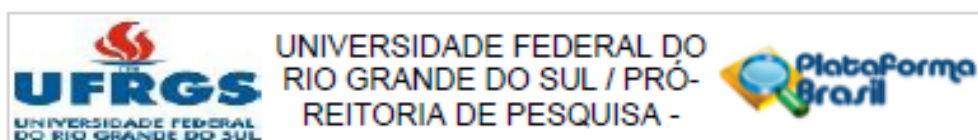
ZHENG, B.-J. et al. The prevalence of urethral and rectal *Mycoplasma genitalium* among men who have sex with men in China, a cross-sectional study. **BMC public health**, v. 14, n. 1, p. 195, 2014. ISSN 1471-2458.

ZONTA, M. A. Novas Metodologias em Citologia Cérvico-Vaginal. In: ROCA (Ed.). **Citologia Clínica Cervico-vaginal**, 2012. cap. 4, p.43-52. ISBN 978-95-4120-024-0.





## VIII.1 Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO CITOLÓGICA, DETECÇÃO DE HPV E DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO EM ESFREGAÇOS DE COLO UTERINO DE MULHERES ATENDIDAS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA DO SUL DO BRASIL

**Pesquisador:** Diogo André Pilger

**Área Temática:** Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

**Versão:** 4

**CAAE:** 12274913.1.0000.5347

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 562.624

**Data da Relatoria:** 20/03/2014

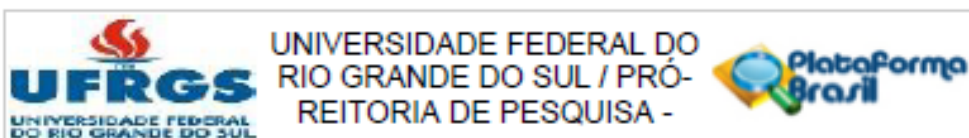
#### Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "AVALIAÇÃO CITOLÓGICA, DETECÇÃO DE HPV E DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO EM ESFREGAÇOS DE COLO UTERINO DE MULHERES ATENDIDAS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA DO SUL DO BRASIL", agora sob o título "AVALIAÇÃO CITOLÓGICA, DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE HPV, DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO E IMUNOCITOQUÍMICA DE ESFREGAÇOS DE COLO UTERINO DE MULHERES ATENDIDAS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA DO SUL DO BRASIL" resultará na dissertação de Denise Wohmelster, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, da Faculdade de Farmácia da UFRGS. A proposta de pesquisa apresentada com o primeiro título foi aprovada por esse CEP, conforme parecer no. 21651 anexado à documentação do atual projeto de pesquisa. Neste momento, os pesquisadores solicitam nova avaliação por motivo de adendos que foram incluídos no texto do projeto de pesquisa. Os pesquisadores justificaram adequadamente os motivos da inclusão das mudanças no texto original do projeto. Em atendimento às solicitações feitas no parecer anterior, documentos adicionais foram anexados.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral da atual versão do projeto de pesquisa é relacionar os achados citológicos com a

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 562.024

presença de diferentes tipos virais do Papilomavirus Humano (HPV) e a expressão imunocitoquímica da proteína S100A4 em esfregaços cêrvico vaginais de pacientes. Pretende ainda identificar fungos potencialmente patogênicos nesses esfregaços, caracterizando entre as espécies encontradas o padrão de suscetibilidade aos antifúngicos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Foram adequadamente corrigida a apresentação de riscos e benefícios.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa com mérito.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os documentos necessários foram apresentados.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após a resposta detalhada dada ao parecer encaminhado pelo CONEP, sugere-se a aprovação do projeto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Encaminhe-se para aprovação.

PORTO ALEGRE, 20 de Março de 2014

---

Assinador por:  
**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
 (Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br

## VIII.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Maior de Idade

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número: \_\_\_\_\_

*1ª Via – Pesquisador responsável*

*2ª Via – Participante da Pesquisa*

Prezada Participante da Pesquisa:

Você está sendo convidada para participar do projeto de pesquisa “**Avaliação citológica, Detecção e identificação de HPV, diagnóstico micológico e imunocitoquímica de esfregaços de colo uterino de mulheres atendidas em um centro de referência do Sul do Brasil**”, desenvolvido pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em parceria com o Laboratório de Citopatologia (Petry & Flôres Ltda) e com o Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS).

Para a realização deste trabalho, gostaríamos de seu consentimento no que diz respeito ao material coletado pelo seu médico ginecologista, constituído por quatro amostras de secreção vaginal, sendo uma destinada ao exame preventivo do câncer de colo de útero, outra será analisada para verificar a presença de fungos e se estes respondem adequadamente ao tratamento com alguns medicamentos existentes, a terceira amostra será destinada à análises para verificar a possível presença de diferentes tipos do vírus HPV e a quarta amostra verificará a presença de uma proteína relacionada com crescimento celular desordenado e invasão de outros órgãos e tecidos. Também será aplicado um questionário relacionado às condições sociais e seu estado de saúde.

Este projeto de pesquisa, para o qual estamos convidando a senhora, está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), o qual é um órgão institucional que tem como função proteger o bem estar dos indivíduos pesquisados, para tanto, qualquer dúvida ou questionamento em relação à pesquisa, você poderá entrar em contato através do e-mail [ética@propesq.ufrgs.br](mailto:ética@propesq.ufrgs.br), pelo telefone (51) 3308-3738 ou então no endereço Av. Paulo Gama, 110, sala 317, Reitoria/Campus Centro – Porto Alegre/RS – CEP: 90040-060. O horário de atendimento é de segunda à sexta-feira, das 8:30 às 12:00 horas e das 14:00 às 18:00 horas.

O principal objetivo deste projeto é relacionar os achados citológicos à presença de diferentes tipos de Papilomavírus Humano (HPV) e de fungos potencialmente patogênicos, caracterizando, entre as espécies encontradas, o padrão de sensibilidade aos medicamentos antifúngicos. Também avaliará a presença de uma proteína relacionada com crescimento celular desordenado, a qual pode caracterizar a evolução das lesões causadas pelo HPV, pois está relacionada com a invasão do câncer em outros órgãos e tecidos. As informações obtidas servirão posteriormente para serem utilizadas em trabalhos, campanhas de prevenção do HPV, infecções e lesões do colo do útero. Os benefícios envolvidos são os de possibilitar o diagnóstico da presença de microrganismos, os quais detectados precocemente evitam o aparecimento de lesões uterinas, que podem acabar desenvolvendo o câncer uterino.

A coleta será realizada no consultório médico, seguindo os padrões de coleta para o exame citológico preventivo (Papanicolaou). Todo o material utilizado na coleta estará devidamente esterilizado, não acarretando danos ou prejuízos adicionais além da coleta do exame preventivo às participantes da pesquisa e, as mesmas não terão custo algum em relação aos exames realizados.

As amostras serão coletadas e os DNAs obtidos após purificação/extração serão armazenados em banco de DNA por um período de 5 anos e, serão utilizadas somente para as análises envolvidas com o presente projeto.

Todos os resultados obtidos serão reencaminhados para seu médico, o qual ficará responsável pelo aconselhamento, acompanhamento e tratamento necessário. No caso de positividade para HPV ou demais infecções que por ventura forem detectadas, após devida confirmação, o médico será informado.

Eventual dano ou fato adverso em decorrência da participação no estudo será devidamente indenizado, e será garantida à assistência integral gratuita à participante da pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informada do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, bem como sobre o procedimento no qual meu material biológico será utilizado e dos benefícios esperados. Além disso, sei que novas informações obtidas durante este estudo me serão fornecidas e terei a liberdade de recusar, desistir ou de interromper a colaboração nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. A minha desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico e, não virá interferir no projeto de pesquisa realizado.

O(a) profissional \_\_\_\_\_ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

\_\_\_\_\_  
Participante da Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_. Pesquisador Responsável: Dr. Diogo André Pilger - Telefone: (51)3388-5276

### VIII.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Menor de Idade

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número: \_\_\_\_\_

*1ª Via – Pesquisador responsável*

*2ª Via – Participante da Pesquisa*

Prezado(a) Responsável pela Participante da Pesquisa:

A pessoa pela qual você é responsável está sendo convidada para participar do projeto de pesquisa “**Avaliação citológica, Detecção e identificação de HPV, diagnóstico micológico e imunocitoquímica de esfregaços de colo uterino de mulheres atendidas em um centro de referência do Sul do Brasil**”, desenvolvido pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em parceria com o Laboratório de Citopatologia (Petry & Flôres Ltda) e com o Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS).

Para a realização deste trabalho, gostaríamos de seu consentimento no que diz respeito ao material coletado pelo médico ginecologista, constituído por quatro amostras de secreção vaginal, sendo uma destinada ao exame preventivo do câncer de colo de útero, outra será analisada para verificar a presença de fungos e se estes respondem adequadamente ao tratamento com alguns medicamentos existentes, a terceira amostra será destinada à análises para verificar a possível presença de diferentes tipos do vírus HPV e a quarta amostra verificará a presença de uma proteína relacionada com crescimento celular desordenado e invasão de outros órgãos e tecidos. Também será aplicado um questionário relacionado às condições sociais e estado de saúde.

Este projeto de pesquisa, está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), o qual é um órgão institucional que tem como função proteger o bem estar dos indivíduos pesquisados, para tanto, qualquer dúvida ou questionamento em relação à pesquisa, você poderá entrar em contato através do e-mail [ética@propesq.ufrgs.br](mailto:ética@propesq.ufrgs.br), pelo telefone (51) 3308-3738 ou então no endereço Av. Paulo Gama, 110, sala 317, Reitoria/Campus Centro – Porto Alegre/RS – CEP: 90040-060. O horário de atendimento é de segunda à sexta-feira, das 8:30 às 12:00 horas e das 14:00 às 18:00 horas.

O principal objetivo deste projeto é relacionar os achados citológicos à presença de diferentes tipos de Papilomavírus Humano (HPV) e de fungos potencialmente patogênicos, caracterizando, entre as espécies encontradas, o padrão de sensibilidade aos medicamentos antifúngicos. Também avaliará a presença de uma proteína relacionada com crescimento celular desordenado, a qual pode caracterizar a evolução das lesões causadas pelo HPV, pois está relacionada com a invasão do câncer em outros órgãos e tecidos. As informações obtidas servirão posteriormente para serem utilizadas em trabalhos, campanhas de prevenção do HPV, infecções e lesões do colo do útero. Os benefícios envolvidos são os de possibilitar o diagnóstico da presença de microrganismos, os quais detectados precocemente evitam o aparecimento de lesões uterinas, que podem acabar desenvolvendo o câncer uterino.

A coleta será realizada no consultório médico, seguindo os padrões de coleta para o exame citológico preventivo (Papanicolaou). Todo o material utilizado na coleta estará devidamente esterilizado, não acarretando danos ou prejuízos adicionais, além da coleta do exame preventivo, às participantes da pesquisa e, as mesmas não terão custo algum em relação aos exames realizados.

As amostras serão coletadas e os DNAs obtidos após purificação/extração serão armazenados em banco de DNA por um período de 5 anos e, serão utilizadas somente para as análises envolvidas com o presente projeto.

Todos os resultados obtidos serão encaminhados para o médico responsável, o qual ficará responsável pelo aconselhamento, acompanhamento e tratamento necessário. No caso de positividade para HPV ou demais infecções que por ventura forem detectadas, após devida confirmação, o médico será informado.

Eventual dano ou fato adverso em decorrência da participação no estudo será devidamente indenizado, e será garantida à assistência integral gratuita à participante da pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_, autorizo a participação do menor \_\_\_\_\_, o qual está sob minha responsabilidade, pois fui informada do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, bem como sobre o procedimento no qual seu material biológico será utilizado e dos benefícios esperados. Além disso, sei que novas informações obtidas durante este estudo nos serão fornecidas e teremos a liberdade de recusar, desistir ou de interromper a colaboração nesta pesquisa no momento em que desejarmos, sem necessidade de qualquer explicação. A desistência não nos causará nenhum prejuízo à saúde ou bem estar físico e, não virá interferir no projeto de pesquisa realizado.

O(a) profissional \_\_\_\_\_ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

\_\_\_\_\_  
Participante da Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Responsável pela participante da Pesquisa

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_. Pesquisador Responsável: Dr. Diogo André Pilger - Telefone: (51)3388-5276



## VIII.4 Termo de Assentimento – Responsável menor de idade

TERMO DE ASSENTIMENTO

Número: \_\_\_\_\_

*1ª Via – Pesquisador responsável*

*2ª Via – Participante da Pesquisa*

Prezada Participante da Pesquisa:

Você está sendo convidada para participar do projeto de pesquisa "**Avaliação citológica, Detecção e identificação de HPV, diagnóstico micológico e imunocitoquímica de esfregaços de colo uterino de mulheres atendidas em um centro de referência do Sul do Brasil**", desenvolvido pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em parceria com o Laboratório de Citopatologia (Petry & Flôres Ltda) e com o Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS).

Para a realização deste trabalho, gostaríamos de seu consentimento no que diz respeito ao material coletado pelo seu médico ginecologista, constituído por quatro amostras de secreção vaginal, sendo uma destinada ao exame preventivo do câncer de colo de útero, outra será analisada para verificar a presença de fungos e se estes respondem adequadamente ao tratamento com alguns medicamentos existentes, a terceira amostra será destinada à análises para verificar a possível presença de diferentes tipos do vírus HPV e a quarta amostra verificará a presença de uma proteína relacionada com crescimento celular desordenado e invasão de outros órgãos e tecidos. Também será aplicado um questionário relacionado às condições sociais e seu estado de saúde.

Este projeto de pesquisa, para o qual estamos convidando a senhora, está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), o qual é um órgão institucional que tem como função proteger o bem estar dos indivíduos pesquisados, para tanto, qualquer dúvida ou questionamento em relação à pesquisa, você poderá entrar em contato através do e-mail [ética@propeq.ufrgs.br](mailto:ética@propeq.ufrgs.br), pelo telefone (51) 3308-3738 ou então no endereço Av. Paulo Gama, 110, sala 317, Reitoria/Campus Centro – Porto Alegre/RS – CEP: 90040-060. O horário de atendimento é de segunda à sexta-feira, das 8:30 às 12:00 horas e das 14:00 às 18:00 horas.

O principal objetivo deste projeto é relacionar os achados citológicos à presença de diferentes tipos de Papilomavírus Humano (HPV) e de fungos potencialmente patogênicos, caracterizando, entre as espécies encontradas, o padrão de sensibilidade aos medicamentos antifúngicos. Também avaliará a presença de uma proteína relacionada com crescimento celular desordenado, a qual pode caracterizar a evolução das lesões causadas pelo HPV, pois está relacionada com a invasão do câncer em outros órgãos e tecidos. As informações obtidas servirão posteriormente para serem utilizadas em trabalhos, campanhas de prevenção do HPV, infecções e lesões do colo do útero. Os benefícios envolvidos são os de possibilitar o diagnóstico da presença de microrganismos, os quais detectados precocemente evitam o aparecimento de lesões uterinas, que podem acabar desenvolvendo o câncer uterino.

A coleta será realizada no consultório médico, seguindo os padrões de coleta para o exame citológico preventivo (Papanicolaou). Todo o material utilizado na coleta estará devidamente esterilizado, não acarretando danos ou prejuízos adicionais, além da coleta do exame preventivo, às participantes da pesquisa e, as mesmas não terão custo algum em relação aos exames realizados.

As amostras serão coletadas e os DNAs obtidos após purificação/extração serão armazenados em banco de DNA por um período de 5 anos e, serão utilizadas somente para as análises envolvidas com o presente projeto.

Todos os resultados obtidos serão reencaminhados para seu médico, o qual ficará responsável pelo aconselhamento, acompanhamento e tratamento necessário. No caso de positividade para HPV ou demais infecções que por ventura forem detectadas, após devida confirmação, o médico será informado.

Eventual dano ou fato adverso em decorrência da participação no estudo será devidamente indenizado, e será garantida à assistência integral gratuita à participante da pesquisa.

De acordo com sua idade, inferior à 18 anos, é necessário que um responsável avalie e autorize sua participação nesta pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informada do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, bem como sobre o procedimento no qual meu material biológico será utilizado e dos benefícios esperados. Além disso, sei que novas informações obtidas durante este estudo me serão fornecidas e terei a liberdade de recusar, desistir ou de interromper a colaboração nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. A minha desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico e, não virá interferir no projeto de pesquisa realizado.

O(a) profissional \_\_\_\_\_ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

\_\_\_\_\_  
Participante da Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_. Pesquisador Responsável: Dr. Diogo André Pilger - Telefone: (51)3388-5276

## VIII.5 Questionário elaborado especificamente para a pesquisa

<b>Código Alfanumérico da Paciente:</b>	
<b>Convênio:</b>	
Data de Nascimento	___/___/___.
Estado Civil:	<input type="checkbox"/> solteira <input type="checkbox"/> casada <input type="checkbox"/> viúva <input type="checkbox"/> divorciada/separada <input type="checkbox"/> companheiro fixo a mais de 1 ano
Grau de Escolaridade	<input type="checkbox"/> Ensino Fundamental Incompleto <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental Completo <input type="checkbox"/> Ensino Médio Incompleto <input type="checkbox"/> Ensino Médio Completo <input type="checkbox"/> Ensino Superior completo <input type="checkbox"/> Ensino Superior Incompleto
Você é fumante?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Você pratica atividade física?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Em que idade você iniciou atividade sexual?	___anos.
Quantos parceiros sexuais você teve ao longa da vida?	
Possui Filhos?	<input type="checkbox"/> sim, quantos? _____. <input type="checkbox"/> não
Qual o método anticoncepcional que você utilizou nos últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/> anticoncepcional oral <input type="checkbox"/> DIU <input type="checkbox"/> métodos de barreira: diafragma ou condom <input type="checkbox"/> tabela menstrual <input type="checkbox"/> esterilização (laqueadura ou vasectomia) <input type="checkbox"/> histerectomia <input type="checkbox"/> outro _____ <input type="checkbox"/> nenhum
Qual a data da sua última menstruação?	__\__\__.
Apresenta corrimento ou prurido?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Você utiliza ou já utilizou algum método de reposição hormonal?	<input type="checkbox"/> sim, qual? _____. <input type="checkbox"/> não
Qual a periodicidade que você realiza o exame preventivo?	<input type="checkbox"/> 1 vez por ano <input type="checkbox"/> a cada 2 anos <input type="checkbox"/> a cada 3 anos <input type="checkbox"/> primeira vez que realizo este exame
Obteve exames citológicos anteriores com resultados alterados?	<input type="checkbox"/> sim. Que alteração? _____. <input type="checkbox"/> não
Você já teve infecção pelo HPV (Papilomavírus Humano)?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Você possui histórico de Candidíase?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Para você, qual a finalidade do exame citológico do colo uterino?	
Você apresentou alguma infecção ginecológica nos últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/> sim, qual? _____. <input type="checkbox"/> não
Você já teve algum tipo de câncer?	<input type="checkbox"/> Sim. Qual? _____. <input type="checkbox"/> Não
Possui antecedentes de câncer de útero na família?	<input type="checkbox"/> sim. Parentesco: _____. <input type="checkbox"/> não