

**ANA CLARA DE SOUZA**

**Caracterização e relação de leveduras do gênero *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal de mulheres com lesões causadas por HPV de alto risco para câncer do colo do útero**

São Paulo  
2016



**ANA CLARA DE SOUZA**

**Caracterização e relação de leveduras do gênero *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal de mulheres com lesões causadas por HPV de alto risco para câncer do colo do útero**

**Versão corrigida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudete Rodrigues Paula

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Souza, Ana Clara de.

Caracterização e relação de leveduras do gênero *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal de mulheres com lesões causadas por HPV de alto risco para câncer do colo do útero / Ana Clara de Souza ; orientador Claudete Rodrigues Paula. -- São Paulo, 2016.

93 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Mucosa oral. 2. Mucosa vaginal. 3. Neoplasias do colo uterino. 4. HPV. 5. *Cândida* spp. 5. Sensibilidade antifúngica. I. Paula, Claudete Rodrigues. II. Título.

Souza AC. Caracterização e relação de leveduras do gênero *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal de mulheres com lesões causadas por HPV de alto risco para câncer do colo do útero. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 17 / 03 / 2017

### **Banca Examinadora**

Profa. Dra. Carina Domaneschi

Instituição: FOUSP Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. Paulo Francisco Ramos Margarido

Instituição: FMUSP Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. Marcos Ereno Auler

Instituição: UNICENTRO Julgamento: APROVADA



***Dedico este trabalho:***

*À Deus presente em todos os momentos, me amparando nas dificuldades, me dando força e paz interior, me colocando no colo nos momentos em que achei que não seria capaz.*

*Aos meus amados pais, Elisabeth e Geraldo, que sempre estiveram ao meu lado, dando todo apoio, amor e principalmente por terem acreditado em mim, muitas vezes mais que eu mesma. São por vocês e para vocês todo meu esforço, trabalho e dedicação.*

*Ao meu irmão, Júlio, pelo amor e apoio que sempre me deu, sempre cuidando e acreditando em mim. À minha cunhada, Lílíane, que é mais que uma cunhada, é uma irmã e amiga, pelos momentos de risos e conversas leves. Ao meu sobrinho, Lorenzo, que é a maior prova de um amor puro.*

*Ao meu namorado, amigo, parceiro e companheiro, Diego, por sempre me apoiar e por sempre me ajudar a encontrar um momento de paz.*

*Aos meus familiares e amigos, sempre compreensivos, me incentivando e me apoiando para alcançar mais este objetivo.*

*Este trabalho também é dedicado, e com especial carinho, às mulheres atendidas pelo Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior, do Hospital das Clínicas, razão desta pesquisa científica. A essas mulheres devo meu crescimento profissional e pessoal.*

*Sem vocês nada seria possível, meu muito obrigada!*





## *Agradecimentos especiais*

*À Professora Doutora Claudete Rodrigues Paula, minha orientadora, por todo conhecimento a mim transmitido, pela ajuda para a realização desta pesquisa e deste sonho em tornar-me mestre;*

*Ao Professor Doutor Marcos Ereno Auler, que desde o início desta caminhada, ainda na iniciação científica, me orienta e me ajuda a alcançar meus objetivos e no desenvolvimento deste trabalho;*

*Ao Professor Doutor Paulo Francisco Ramos Margarido, que tornou possível o contato com as pacientes atendidas, pelas orientações e ajuda principalmente na parte clínica e por todo apoio a mim dispensado;*

*À Professora Doutora Carina Domaneschi, pela colaboração e amizade que enriqueceram o meu aprendizado.*

*Meu muito obrigada, jamais esquecerei o que vocês fizeram por mim.*



## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de São Paulo, em especial a Faculdade de Odontologia, que tão bem me recebeu, representada pelo Diretor Professor Dr. Waldyr Antônio Jorge, e ao Departamento de Estomatologia, na pessoa do seu Chefe Professor Dr. Giuseppe Alexandre Romito, pela oportunidade;

Aos Professores Dra. Silvia Vanessa Lourenço e Dr. Celso Augusto Lemos Junior pelo suporte dado dentro do Programa de Pós-Graduação. Ao Professor Dr. Edgar Michel Crosato e ao Dr. Paulo Roberto da Silva pela assessoria científica na realização do tratamento estatístico dos dados, interpretação e discussão dos resultados;

Às micologistas, Dra. Luciana da Silva Ruiz, Dra. Maria Walderez Szeszs e Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem do Instituto Adolfo Lutz e a Dra. Débora Moreira do Instituto Educacional Irineu Evangelista de Souza, por todo apoio para realização da pesquisa, por todo conhecimento compartilhado e palavras amigas;

À Iracema Mascarenhas Pires, Maria Cecília Forte Muniz, Marília Camargo Gomes e Rita Dina Mascarenhas Pires, pela amizade, compreensão, apoio e incentivo nestes anos. À Glauci Elaine Damasio Fidelis pela atenção e esclarecimentos bibliográficos para a finalização da minha dissertação de Pós-Graduação, e a todos os funcionários da biblioteca e da seção de Pós-Graduação da FO-USP, pela atenção e ajuda a mim dada.

Aos Professores e colegas do Programa de Diagnóstico Bucal.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baract do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da USP, à Dra. Maricy Tacla, à Dra. Noely Paula Cristina Lorenzi e a todo corpo médico do Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior, por toda ajuda e disponibilidade, tornando possível o contato com as pacientes, bem como o exame, coleta de materiais e acesso aos dados clínicos das mesmas.

À CAPES pela bolsa de Mestrado que me possibilitou a dedicação em tempo integral à realização desta pesquisa científica.

E, já que sem amigos nada somos não poderia deixar de agradecer pessoas que estiveram presente, compartilhando meus momentos de alegria ou aqueles não tão alegres. Agradeço a todos, em especial alguns que de modo mais que especial sempre estarão em meu coração: Aline Silva, Aline Yamanaka, Ana Julia Penteadó, Dalyne Kaílla Taques Gonçalves, Fran Bonato, Giuliane Balhuk, José Gabriel Alencar, Juliete Avelar, Karoline Vaz, Thais Satiko Yano, Thiele Rosales, Vinícius Belvedere e Wesley Mateus dos Santos.

À todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho,

Muito obrigada.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

*Madre Teresa de Calcutá*

## RESUMO

Souza AC. Caracterização e relação de leveduras do gênero *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal de mulheres com lesões causadas por HPV de alto risco para câncer do colo do útero [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Este estudo caracterizou e relacionou as leveduras do gênero *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal de mulheres com lesões causadas por HPV de alto risco para câncer do colo do útero. Foram examinadas 42 mulheres tratadas no ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sendo, 30 com lesões uterinas de alto grau (G1) com média de idade de 36,5 anos  $\pm$  11,1 e 12 com lesões uterinas de baixo grau (G2) com média de idade de 34,75 anos  $\pm$  15,5. Condições clínicas e dados laboratoriais sobre HPV foram coletados do prontuário médico das pacientes; os dados sócio-demográficos obtidos a partir de um questionário apropriado. Para o estudo de associação entre as variáveis foi utilizada a análise de razão de chance (Odds Ratio) a partir do programa STATA 13.1. Foram identificadas associação entre lesões uterinas de baixo grau com cultura positiva em mucosa oral (OR= 0,215) e com presença de doenças crônicas (OR = 0,167), sendo que pacientes com lesões uterinas de alto grau possuem maior prevalência para diabetes e os resultados indicaram 23% de prevalência de *Candida spp.* em mucosa oral e 27% em mucosa vaginal, em pacientes do G1, no G2 foi de 42% em mucosa oral e de 33% em mucosa vaginal. Entre as espécies encontradas em mucosa oral e vaginal das pacientes, *Candida albicans* foi a mais isolada com 88%, seguida de *C. tropicalis* (8%) e *C. glabrata* (4%). As cepas de *C. albicans* isoladas de ambas as mucosas apresentaram sensibilidade a todos os antifúngicos testados, ao contrário da cepa de *C. tropicalis* isolada no Grupo 2, em mucosa vaginal, que apresentou um perfil de resistência ao fluconazol. Assim, torna-se importante o acompanhamento e supervisão por meio de exames clínicos e laboratoriais das pacientes com HPV, reforçando a necessidade sobre cuidados, tratamento e prevenção de infecções relacionadas ao HPV e a *Candida spp.*

Palavras-chave: Mucosa oral. Mucosa vaginal. Câncer do colo do útero. HPV. *Candida spp.*. Sensibilidade antifúngica.

## ABSTRACT

Souza AC. Characterization and relation of yeasts of the genus *Candida* isolated from the oral and vaginal mucosa e of women with lesions caused by high risk HPV for cervical cancer [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

This study characterized and related yeasts of the genus *Candida* isolated from the oral and vaginal mucous membranes of women with lesions caused by high-risk HPV for cervical cancer. Forty-two women treated at the Lower Genital Tract Pathology Clinic of the University of São Paulo Medical School's Hospital of Clinics were examined, with 30 high-grade (G1) uterine lesions with a mean age of 36.5 years  $\pm$  11, 1 and 12 with low grade (G2) uterine lesions with a mean age of 34.75 years  $\pm$  15.5. Clinical conditions and laboratory data on HPV were collected from patients' medical records; the socio-demographic data obtained from an appropriate questionnaire. For the study of association between the variables, Odds Ratio analysis was used from the STATA 13.1 program. An association between low grade uterine lesions with positive culture in oral mucosa (OR = 0.215) and presence of chronic diseases (OR = 0.167) was identified. Patients with high grade uterine lesions had a higher prevalence for diabetes and the results indicated 23% prevalence of *Candida spp.* In oral mucosa and 27% in vaginal mucosa, in G1 patients, in G2 it was 42% in oral mucosa and 33% in vaginal mucosa. Among the species found in oral and vaginal mucosa of patients, *Candida albicans* was the most isolated with 88%, followed by *C. tropicalis* (8%) and *C. glabrata* (4%). The strains of *C. albicans* isolated from both mucosa presented sensitivity to all tested antifungal agents, unlike the *C. tropicalis* strain isolated in Group 2, in vaginal mucosa, which presented a resistance profile to fluconazole. Thus, monitoring and supervision through clinical and laboratory testing of HPV patients is important, reinforcing the need for care, treatment and prevention of HPV-related infections and *Candida spp.*

Keywords: Mouth mucosa. Vaginal mucosa. Uterine Cervical Neoplasms. HPV. *Candida spp.* Antifungal sensitivity.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 2.1 - Alterações celulares e os estágios da Neoplasia Intra-epitelial Cervical no colo uterino..... | 33 |
| Figura 4.1 - Formação de tudo germinativo (seta) em amostras de <i>C. albicans</i> .....                   | 46 |
| Figura 4.2 - Microcultivo em lâmina de <i>C. albicans</i> .....  | 47 |
| Figura 5.1 - Cultivo de <i>Candida albicans</i> em ágar Sabouraud dextrose.....                            | 58 |
| Figura 5.2 - Cultivo de <i>C. albicans</i> em meio cromogênico. ....                                       | 58 |
| Figura 5.3 - Microcultivo em lâmina de <i>C. glabrata</i> .....  | 59 |



## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1 - Prevalência de doenças crônicas nos dois grupos de pacientes com HPV de alto risco para câncer do colo do útero. ....52
- Gráfico 5.2 - Positividade de cultura para *Candida albicans* em mucosas oral e vaginal nos Grupos 1 e 2 .....56
- Gráfico 5.3 - Prevalência das espécies de *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal das pacientes dos Grupos 1 e 2. ....57



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 4.1 - Interpretação do comportamento de cepas de leveduras frente à concentração dos antifúngicos ( $\mu\text{g/mL}$ ). .....                         | 50 |
| Tabela 5.1 - Relação entre a presença de doenças crônicas e cultura positiva para <i>Candida spp.</i> em mucosa vaginal.. .....                              | 51 |
| Tabela 5.2 - Relação entre a presença de doenças crônicas e cultura positiva para <i>Candida spp.</i> em mucosa oral.....                                    | 52 |
| Tabela 5.3 - Relação entre presença de sinais clínicos para infecção vulvovaginal e cultura positiva para <i>Candida spp.</i> .. .....                       | 53 |
| Tabela 5.4 - Associação entre lesões de alto e baixo grau com informações sócio-demográficas das pacientes .....   | 53 |
| Tabela 5.5 - Associação entre lesões de alto e baixo grau com informações culturais das pacientes.....   | 54 |
| Tabela 5.6 - Associação entre lesões de alto e baixo grau com hábitos das pacientes.....   | 54 |
| Tabela 5.7 - Associação entre lesões de alto e baixo grau com informações clínicas das pacientes. ....   | 55 |
| Tabela 5.8 - Relação de culturas positivas para <i>Candida spp.</i> em mucosas oral e vaginal, de pacientes dos Grupos 1 e 2, e as espécies envolvidas. .... | 60 |

Tabela 5.9 - Associação entre lesões de alto e baixo grau com a cultura para *Candida spp.* de mucosas oral e vaginal.....61

Tabela 5.10 - Resultados do CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos por teste de microdiluição com leveduras isoladas das mucosas oral e vaginal das pacientes com lesões uterinas de alto grau (Grupo 1) e baixo grau (Grupo 2) ....62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                        |   |
|------------------------|---|
| ADH                    | Álcool desidrogenase  |
| AFST                   | Antifungal susceptibility testing   |
| ASD                    | Ágar Sabouraud Dextrose   |
| ATCC                   | American Type Culture Collection  |
| <i>Candida sp.</i>     | Espécie do gênero <i>Candida</i>  |
| <i>Candida spp.</i>    | Espécies do gênero <i>Candida</i>   |
| <i>C. albicans</i>     | <i>Candida albicans</i>   |
| <i>C. glabrata</i>     | <i>Candida glabrata</i>   |
| <i>C. tropicalis</i>   | <i>Candida tropicalis</i>   |
| <i>C. parapsilosis</i> | Complexo <i>Candida parapsilosis</i>  |
| CC                     | Câncer Cervical   |
| CIM                    | Concentração Inibitória Mínima  |
| CLSI                   | Clinical and Laboratory Standards Institute                                 |
| CVV                    | Candidíase Vulvovaginal   |
| CVVR                   | Candidíase Vulvovaginal Recorrente  |
| DIU                    | Dispositivo Intra-uterino   |
| DNA                    | Ácido Desoxirribonucleico   |
| EUCAST                 | European Committee on Antibiotic Susceptibility                             |
| FOUSP                  | Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo                       |
| HC-FMUSP               | Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| HIV                    | Vírus da Imunodeficiência Humana  |
| HPV                    | Papilomavírus Humano  |
| INCA                   | Instituto Nacional de Câncer  |
| IST                    | Infecção Sexualmente Transmissível  |
| ITS                    | Espaçadores Internos Transcritos  |
| MOPS                   | Morpholinepropanesulfonic Acid  |
| NBMA                   | N-nitroso-benzilmetilamina  |
| NIC                    | Neoplasia Intra-epitelial Cervical  |

|       |   |
|-------|---|
| NCCLS | National Committe for Clinical Laboratory Standards |
| PTGI  | Patologia do Trato Genital Inferior                 |
| R     | Resistente  |
| RPMI  | Roswell Park Memorial Institute                     |
| S     | Sensível  |
| TCLE  | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido          |



## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>  | <b>31</b> |
| 2.1      | Câncer do colo do útero .....  | 31        |
| 2.2      | Infecção por Papilomavírus Humano .....  | 32        |
| 2.3      | Candidíase vulvovaginal.....   | 34        |
| 2.4      | Candidíase oral.....   | 35        |
| 2.5      | <i>Candida spp.</i> como fator de risco.....   | 36        |
| 2.6      | Perfil de sensibilidade aos antifúngicos .....   | 37        |
| <b>3</b> | <b>PROPOSIÇÃO.....</b>   | <b>41</b> |
| 3.1      | Objetivo geral .....   | 41        |
| 3.3      | Objetivos específicos.....   | 41        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>43</b> |
| 4.1      | Casuística.....  | 43        |
| 4.2      | CrITÉRIOS de exclusão .....  | 44        |
| 4.3      | CrITÉRIOS de inclusão .....  | 44        |
| 4.4      | Coleta do material .....   | 44        |
| 4.5      | Identificação das leveduras isoladas .....   | 45        |
| 4.5.1    | Caracterização macromorfológica.....   | 45        |
| 4.5.2    | Caracterização micromorfológica.....   | 45        |
| 4.5.2.1  | <i>Prova de produção de tubo germinativo</i> .....   | 46        |
| 4.5.2.2  | <i>Microcultivo em ágar fubá</i> .....   | 47        |
| 4.5.3    | Semeadura em meio cromogênico .....  | 48        |
| 4.6      | Perfil de sensibilidade aos antifúngicos .....   | 48        |
| 4.6.1    | Microdiluição – EUCAST.....  | 49        |
| 4.7      | Análise Estatística.....   | 50        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>51</b> |
| 5.1      | Casuística.....  | 51        |
| 5.2      | Doenças crônicas e sinais clínicos de infecção vaginal .....   | 51        |
| 5.3      | Correlação entre dados sócio-demográficos, culturais e clínicos das<br>pacientes com lesões uterinas de alto e baixo grau..... | 53        |

|  |    |
|--|----|
| 5.4 Colonização oral e vaginal por <i>Candida spp.</i> ..... | 55 |
| 5.5 Identificação das leveduras isoladas .....               | 56 |
| 5.5.1 Caracterização macromorfológica.....                   | 57 |
| 5.5.2 Caracterização micromorfológica.....                   | 59 |
| 5.5.2.1 Prova de produção de tubo germinativo.....           | 59 |
| 5.5.2.2 Microcultivo em ágar fubá.....                       | 59 |
| 5.6 Perfil de sensibilidade aos antifúngicos .....           | 61 |
| 6 DISCUSSÃO.....   | 63 |
| 7 CONCLUSÕES.....  | 71 |
| REFERÊNCIAS .....  | 73 |
| ANEXOS.....  | 85 |

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero ou câncer cervical (CC) é o terceiro câncer mais comumente diagnosticado no mundo e a quarta principal causa de morte por câncer entre as mulheres. Em 2012 foram 527.600 novos casos e 265.700 mortes relacionadas ao CC em todo o mundo sendo que cerca de 90% das mortes por câncer do colo do útero ocorrem em países em desenvolvimento. Nos países da América Latina, o CC causou mais de 28.000 mortes femininas em 2012. Estima-se que em 2016 foram 16.340 novos casos no Brasil (Bermedo-Carrasco; Waldner, 2016; INCA, 2016; Rashidet. al., 2016; Xiao et. al., 2016)

O principal agente relacionado ao câncer do colo uterino é o Papilomavírus Humano (HPV). Os HPV são vírus capazes de infectar a pele ou as mucosas. Existem mais de 150 tipos diferentes de HPV, e cerca de 40 podem infectar o trato ano-genital causando alterações celulares geradas por infecções persistentes por tipos específicos deste vírus (INCA, 2016; Rashid et. al., 2016).

Os genotipos são divididos em "tipo de alto risco", onde se encaixam os conhecidos como oncogênicos (genotipos 16, 18, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 58 entre outros), e em "tipo de baixo risco" que geralmente causam lesões benignas, como os genotipos 6, 11, 40, 42, 43, 44 e 55. Os do tipo alto risco estão implicados em 99% dos casos do câncer cervical, de 40 a 80% dos casos de cânceres anogenitais e em aproximadamente 25% dos cânceres de cabeça e pescoço. Os genotipos HPV-16 e HPV-18 são os mais associados com neoplasias intra-epiteliais cervicais de alto grau (NIC II e III), responsáveis por 70% de todos os carcinomas cervicais invasivos, seguidos pelos genotipos 45, 31 e 33 (Cordel et. al., 2015; Sung et. al., 2016; Xiao et. al., 2016).

Em mucosa oral, os genotipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 42 já foram isolados entre os mais de 150 tipos de HPV existentes. Estima-se que 0,4% da população possuem verrugas e condilomas na boca, enquanto até 12% dos indivíduos com mucosa oral saudável podem ter o vírus na forma latente

(Miller; Johnstone, 2001). Os mecanismos carcinogênicos das infecções virais estão relacionados com a sua interação com a regulação gênica, como a imortalização celular (Park et. al., 1992; Meurman, 2010).

Embora a infecção pelo HPV seja necessária para gerar o câncer do colo do útero, ele sozinho não é suficiente para causar tal lesão, sendo necessária a identificação de outros fatores de risco referentes à infecção pelo vírus e ao CC. Fatores de risco clínico-epidemiológicos, como idade precoce de casamento, múltiplos parceiros sexuais, higiene genital, tabagismo, entre outros, estão frequentemente associados ao desenvolvimento de câncer cervical (Pinto et. al., 2002; INCA, 2016; Rashid et. al., 2016), enquanto o uso de dispositivos intra-uterinos (DIU) parece exercer um efeito protetor ao desenvolvimento de CC (Shaw et. al., 2016).

Em relação a estes fatores de risco para infecção por HPV poucos estudos foram realizados, gerando dificuldade na identificação destes. Observando-se apenas um risco elevado de infecção por este vírus associado a outras infecções como por *Chlamydia trachomatis*, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e *Gardnerella vaginalis* (Koskela et. al., 2000; Shaw et. al., 2016).

Inflamações recorrentes facilitam a proliferação celular, ajudam no crescimento de células malignas, liberam citocinas, quimiocinas, radicais livres, entre outros fatores, o que indica que em uma paciente com microbiota anormal podem ocorrer mais alterações celulares do que em pacientes com microbiota normal (Moss; Blaser, 2005; Daí et. al., 2010; Roeters et. al., 2010). Diante disto em 2012, Rodriguez-Cerdeira et. al. avaliaram a associação entre infecções vaginais com infecção por HPV de alto risco para câncer do colo do útero, incluindo candidíase vulvovaginal, devido a alta patogenicidade de *Candida albicans* em permitir a penetração na mucosa, induzindo edema e descamação celular, um dos poucos trabalhos na literatura que buscaram observar esta associação. No entanto eles não encontraram associação, gerando interesse para novos estudos.

Embora existam várias evidências da relação de *Candida spp.* em vários tipos de câncer epitelial, a candidíase vulvovaginal ainda não parece ser um fator de risco para carcinoma cervical ou lesões cervicais displásicas, sendo o maior interesse a relação *Candida spp.* e carcinoma esofágico e oral (Alnuaimi et al., 2015).

Em relação à mucosa oral e o câncer bucal, o carcinoma espinocelular é o tipo mais frequente com 90% dos casos, e os fatores de risco estão bem delineados (Pires et al., 2013). Entre eles a formação de pró-carcinogênios como o acetaldeído a partir da ingestão do álcool (Nieminem et al., 2009; Uittamo et al., 2009), tabagismo e agentes infecciosos, como o HPV e a candidíase crônica (Schmidt et al., 2004; Meurman, 2010; Alnuaimi et al., 2015; Sahingur; Yeudall, 2015).

Espécies de *Candida* podem colonizar a cavidade oral em até 50% dos pacientes saudáveis, entretanto alguns fatores locais como uso de prótese (Henrique et al. 2009) ou sistêmicas, como deficiências nutricionais e imunossupressão (Scalercio et al., 2007), podem desencadear a transformação dessa relação de comensal para patogênica (Sardi et al., 2013). Em 1969 dois artigos foram os pioneiros em correlacionar a presença de candidíase oral com a progressão de displasia epitelial da mucosa oral (Cawson, 1969; Williamson, 1969). Contudo, atualmente existem poucos dados que permitam afirmar essa relação patogênica (Meurman; Uittamo, 2008; Van Der Waal, 2010). Dados estes não encontrados em relação à mucosa vaginal.

Atualmente a hipótese mais aceita sobre o efeito carcinogênico das espécies de *Candida* sobre o epitélio mucoso é relacionado à produção de carcinogênios, ou a participação no metabolismo de pró-carcinogênios (Mohd Bakriet al., 2010). Estudos de Krogh et al., 1987; Krogh, 1990; Ramirez-Garcia et al., 2014, foram publicados sugerindo a participação de *Candida albicans* na produção de nitrosaminas, um carcinogênio oral, dados estes que sugerem, inclusive, que *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* podem produzir maiores quantidades de acetaldeído do que as outras espécies.

A importância entre a correlação da mucosa oral e vaginal está na possibilidade da transmissão da candidíase ocorrer da relação sexual-oral/vaginal assim como a transmissão pelo HPV. Um estudo realizado por Castro-Silva et. al. (2012) observou que a prática de sexo oral é muito comum e que o uso de preservativo é quase nulo, o que aumenta a forma de transmissão de várias doenças consideradas como sexualmente transmissíveis, como por exemplo, a candidíase e o HPV.

No entanto ainda são escassos os estudos que mencionam a capacidade de *Candida spp.* em produzir carcinogênios em mucosa vaginal e induzir o câncer cervical. Por isso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar e relacionar leveduras do gênero *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal de mulheres com lesões causadas por HPV de alto risco para câncer do colo do útero, assim como avaliar as características fenotípicas dos isolados e o perfil epidemiológico das pacientes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero é causado pela infecção persistente de alguns tipos oncogênicos do vírus HPV (Rashid et al., 2016). É um tumor que se desenvolve a partir de alterações do colo do útero, sendo essas alterações chamadas de lesões precursoras, e são totalmente curáveis na maioria das vezes, porém se não tratadas, podem, após muitos anos, se transformar em câncer (Coser et al., 2016; INCA, 2016).

As lesões precursoras e o câncer em estágio inicial não apresentam sinais ou sintomas, entretanto conforme a doença avança podem aparecer sangramento vaginal, corrimento e dor (INCA, 2016).

É o terceiro câncer mais frequente na população feminina, atrás do câncer de mama e do colo retal, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. A maioria das mortes por este câncer ocorre em países em desenvolvimento, como o Brasil. Infecções com HPV de alto risco são detectados na maioria dos carcinomas cervicais, sendo os mais comuns os tipos HPV-16 e HPV-18 (Lowy; Schiller, 2012; INCA, 2016; Rashid et al., 2016).

Entretanto, além da presença do HPV de alto risco é necessário que se acumule alterações genéticas no genoma da célula hospedeira para que lesões pré-cancerosas progridam para o carcinoma. É o fenótipo imortal das inúmeras células cancerígenas que as distingue das células somáticas normais, visto que estas se dividem em um número finito de vezes antes de entrar em senescência (Cohen et al., 2007; Molano et al., 2016).

Outra enzima que parece estar relacionada com o carcinoma cervical é a glicose-6-fosfato que possui níveis elevados em vários tumores, e está ligada ao estresse oxidativo por inibir a proliferação celular e aumentar a apoptose.

Porém quando em mulheres infectadas por HPV-16 e HPV-18 esta enzima tem suas funções diminuídas (Hu et al., 2015; Hu et al., 2016).

## **2.2 Infecção por Papilomavírus Humano**

Os Papilomavírus Humano são vírus capazes de infectar a pele ou as mucosas. Atualmente, são conhecidos mais de 150 tipos de HPV e cerca de 40 destes possuem afinidade pelo epitélio escamoso do trato genital inferior, que é composto pelo colo, vulva, corpo do períneo, região perianal e anal (INCA, 2016; Sung et al., 2016).

É uma das causas mais comuns de doenças sexualmente transmissíveis, possuindo a capacidade de infectar o tecido epitelial; e cerca de 5 a 40% das mulheres sexualmente ativas apresentam positividade em testes moleculares para HPV (Coser et al., 2016; Shaw et al., 2016).

A transmissão do vírus se dá por contato direto com a pele ou mucosa infectada. A principal forma é por via sexual, que inclui contato oral-genital, genital-genital ou mesmo anal-genital. Assim sendo, o contágio com o HPV pode ocorrer mesmo na ausência de penetração vaginal ou anal. A transmissão pode ocorrer também durante o parto (Souza, 2015; INCA, 2016).

O HPV pode estabelecer uma relação inofensiva com o hospedeiro, passando despercebido e regredindo espontaneamente, porém com a persistência do vírus podem surgir lesões benignas ou progredir para o câncer, principalmente no colo do útero, mas também na vagina, vulva, ânus, pênis, orofaringe e boca (Coser et al., 2016; INCA, 2016).

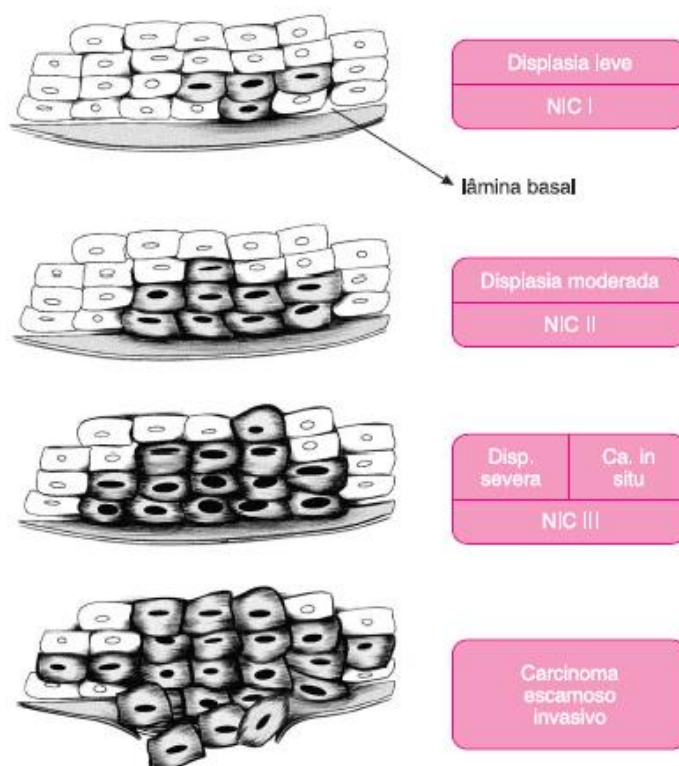
A persistência do HPV e a progressão para o câncer do colo do útero dependem de vários fatores, como idade, tabagismo, uso prolongado de contraceptivos, comportamento sexual e co-infecção com outros agentes infecciosos de transmissão sexual, entre outras (Coser et al., 2016).



Pelo menos 13 tipos de HPV são considerados oncogênicos, apresentando maior risco ou probabilidade de provocar infecções persistentes e estar associados a lesões precursoras. Dentre os HPV de alto risco oncogênico, os tipos 16 e 18 estão presentes em 70% dos casos do câncer do colo do útero (Cosser et al., 2016; INCA, 2016; Sung et al., 2016).

Alguns são considerados como de baixo risco para o desenvolvimento de câncer, sendo os mais comuns os sorotipos 6 e 11, relacionados a lesões benignas, como condiloma e Neoplasias Intra-epitelial Cervical – NIC I. Já os de médio e alto risco, sorotipos 16 e 18, são relacionados a lesões de alto grau – NIC II, III e carcinoma. A figura 2.1 ilustra as alterações celulares e os estágios de Neoplasia Intra-epitelial Cervical no colo uterino (Zardo et al., 2014; Souza, 2015; Brito et al., 2016)

Figura 2.1 - Alterações celulares e os estágios da Neoplasia Intra-epitelial Cervical no colo uterino



Fonte: Inca, 2002

Na forma latente da infecção, a paciente não apresenta lesões clínicas, e a única forma de ser diagnosticada é por exame molecular que mostram a presença do DNA do vírus. Entretanto, não é indicado procurar diagnosticar a presença do HPV, mas sim suas manifestações clínicas. Quando em infecção subclínica, não são observadas lesões a olho nu, sendo necessário diagnóstico por citopatologia, histologia ou do uso de instrumentos com poder de aumentar sua visualização após a aplicação de reagentes químicos para contraste como ocorre na colposcopia, peniscopia e anoscopia (Leto et. al., 2011; Souza, 2015; INCA, 2016). Já na forma clínica, existem lesões visíveis, representada pelo condiloma acuminado, quase sem nenhum potencial de progressão ao câncer (INCA, 2002).

O Papanicolaou é um exame citopatológico preventivo do câncer do colo uterino, que consiste na análise em microscópio das células coletadas da ectocérvice e da endocérvice do colo do útero. Durante a coleta das amostras, deve ser realizado um exame visual, onde pode ser observada presença de lesão no colo do útero (INCA, 2002).

### **2.3 Candidíase vulvovaginal**

A candidíase vulvovaginal (CVV) é causada por leveduras do gênero *Candida*, dentre as mais comuns, a *Candida albicans*, que pode ser isolada em 80 a 95% dos casos. Apesar da alta incidência de *C. albicans* outras espécies não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, obtiveram um aumento em sua frequência, devido ao aumento do uso indiscriminado de antifúngicos tópicos e sistêmicos, principalmente os de dose única (Mintz; Martens, 2013; Peixoto et al., 2014). É a segunda maior causa de infecção vaginal, podendo afetar até 75% das mulheres em idade fértil, sendo que 5% delas terão infecções recorrentes (Medeiros, 2013; Cassone, 2015).

Para a saúde da mulher é uma condição de grande importância, pois afeta milhões de mulheres por ano, gerando desconforto, interferindo nas relações sexuais e afetivas, podendo prejudicar o desempenho no trabalho.

Todo ano, nos Estados Unidos, gera gastos na ordem de milhões de dólares, entre diagnósticos e tratamento, além da perda de produtividade da paciente; promovendo cerca de 10 milhões de visitas em consultórios ginecológicos (Barbosa et al., 2012; Rodrigues et al., 2013; Gunther et al., 2014). Por não ser uma doença de notificação não existem dados oficiais sobre os gastos no Brasil.

Os sinais e sintomas da CVV são caracterizados principalmente por prurido, edema, ardência, rubor, fissuras e secreção branca grumosa (Pereira et. al., 2012; Peixoto et. al., 2014). Por alguns autores é classificada como simples e recorrente, em que a forma simples é caracterizada pelos sintomas inflamatórios que ocorrem de forma ocasional e a candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) ocorre de forma cíclica e frequente, assim é necessário que haja três ou mais casos de candidíase diagnosticados ao ano (Cassone et. al., 2007; Lucas et. al., 2012). Na prática, a manifestação clínica é utilizada para o diagnóstico da CVV, porém essas informações não são suficientes, sendo indicados exames laboratoriais para um diagnóstico completo e correto (Ferris et. al., 2002).

Apesar das espécies de *Candida* colonizarem a microbiota vaginal das pacientes, a origem da candidíase pode ser por via exógena, quando transmitida pelo parceiro sexual, podendo ser considerada como uma Infecção Sexualmente Transmissível – IST (Barbedo; Sgarbi, 2010; Cassone, 2015; Peixoto et. al., 2014).

## **2.4 Candidíase oral**

Em mucosa oral a candidíase é uma infecção oportunista bastante frequente, pois a *Candida* faz parte da microbiota oral como um micro-organismo comensal. No entanto, possui vários fatores que aumentam a sua virulência, como por exemplo, a capacidade deste fungo invadir camadas superficiais do epitélio a partir da produção de hifas e de proteinases, atividade

que é aumentada em pH ácido encontrado em saliva de pacientes doentes (Sitheeque; Samaranayake, 2003; Sanjaya et al., 2011).

O aumento de *Candida spp.* é bastante evidente em pacientes fumantes, que pode ser devido ao aumento de queratinização epitelial, redução de IgA salivar e diminuição da função de polimorfonucleares, entre outros fatores. A queratinização epitelial influencia principalmente na melhor aderência de *Candida sp.* na cavidade oral, influenciando na patogenicidade do fungo e no desenvolvimento de pré-câncer e câncer (Meurman, 2010). Estudos demonstraram a capacidade de *C. albicans* em induzir hiperplasia epitelial e confirmaram a resposta hiperplásica do epitélio quando invadido por *Candida spp.* (Meurman, 2010, Sanjaya et al., 2011).

## **2.5 *Candida spp* como fator de risco**

Um número crescente de espécies de *Candida* não-*albicans* vem sendo observadas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, como os pacientes com câncer bucal. *Candida sp.* em geral é mais prevalente em lesões de carcinoma do que em mucosa bucal saudável. As leveduras podem invadir o epitélio oral e também podem estar casualmente envolvidas na leucoplasia oral e alterações displásicas (Dahiya et al., 2003; Meurman, 2010).

*Candida albicans* pode estar relacionada com a colonização de lesões orais pré-malignas ou malignas existentes, porém também podem promover a geração e progressão para o câncer. Um forte argumento para o papel carcinogênico de *Candida spp.* é a produção de carcinógenos como a formação de potentes carcinogênios N-nitroso-benzilmetilamina (NBMA) e o acetaldeído (Hooper et al., 2009; Ramirez-Garcia et al., 2014). A produção de proteinases e mediadores pró-inflamatórios por *Candida spp.* também podem contribuir, indiretamente, para a carcinogênese, degradando as proteínas da superfície da membrana e componentes da matriz extracelular (Kurago et al., 2008; Mohd Bakri et al., 2010; Gall et al., 2013; Hettman et al., 2016).

A NBMA é um composto pró-carcinogênico bastante relacionado com câncer de esôfago, pela alta concentração de nitratos e nitritos obtidos de alimentos. Estudos relacionam o potencial catalítico de leveduras isoladas de lesões de leucoplasia e de mucosa normal em produzir NBMA a partir dos precursores N-benzil-metilamina e nitrito. Indicando que as espécies de *C. albicans* apresentaram o maior potencial de nitrosação, enquanto que *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* foram classificadas como as mais baixas (Hsia et al., 1981; Krogh, 1990; Ramirez-Garcia et al., 2014).

Testes “in vitro” com cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com câncer oral apresentaram a capacidade de produzir altos níveis de acetaldeído carcinogênico, o que pode fornecer a possível explicação para a gênese do carcinoma epidermóide. O acetaldeído é um produto intermediário da via do piruvato, que converte o piruvato em acetil-CoA no citosol sob baixa tensão de oxigênio ou em condições anaeróbias durante a fermentação (Nieminem et al., 2014; Alnuaimi et al., 2015; Bakri et al., 2015).

Existem cinco genes que codificam enzimas álcool desidrogenase (ADH) para *C. albicans*, uma delas é a ADH1 que codifica uma enzima capaz de funcionar na conversão de acetaldeído em etanol, tornando o uso do etanol como fonte de carbono e energia. Estudos proteômicos demonstraram que a ADH1 é um dos fatores que controlam a formação e o crescimento do biofilme em fungos (Nieminem et al., 2014).

Entretanto, não existem dados que relacionem a capacidade de *Candida spp.* em produzir carcinogênios em mucosa vaginal, o que poderia ser também um outro fator de risco para o câncer do colo do útero.

## **2.6 Perfil de Sensibilidade aos antifúngicos**

O perfil de sensibilidade aos antifúngicos é a forma como as espécies de fungos se comportam frente a diferentes concentrações dos antifúngicos

existentes, sendo classificadas como sensíveis ou resistentes a terapia. A sensibilidade às drogas antifúngicas varia entre as diferentes espécies de *Candida*, fato este que realça a importância em se identificar as espécies relacionadas a infecção, bem como em determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos para que, dessa forma, seja possível evitar o aparecimento de cepas resistentes, realizando a conduta terapêutica adequada ao paciente (St-Germain et al., 2001).

Existem vários testes que podem ser usados para a determinação da sensibilidade antifúngica, tais como a diluição em meio líquido por técnicas de macro e microdiluição, como o EUCAST, e difusão em ágar a partir de discos e fitas, como o E-test, com concentrações variáveis de antifúngicos.

A validação e a aceitação de novos métodos podem variar, sendo que todos buscam a concordância com os métodos preconizados pelo órgão que inicialmente foi chamado de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) e hoje se chama CLSI – “Clinical for Laboratory Standards Institute” (Rex et al., 2001; Pfaller et al., 2007).

Em 1992 foi publicado pelo NCCLS o documento M27-P, que estabelece valores de referência para a realização dos testes de sensibilidade "in vitro" pelos métodos de macro e microdiluição em caldo e define a interpretação da concentração inibitória mínima (CIM) para avaliar a eficácia de alguns antifúngicos (Duranet et al., 2003; Sanglard, 2002; Takakura et al., 2004; Espinel-Ingroff et al., 2006), principalmente para *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans* (Linares et al., 2005). Em 2002, foi aprovado o documento M27-A2, propondo algumas alterações ao documento M27-A, publicado anteriormente (Acikgozet. al., 2004; Anredrupet. al., 2001). E, em 2008, foi publicado o documento M27-A3 que inclui os valores de sensibilidade e resistência às drogas anidulafungina para os ensaios de susceptibilidade para *Candida spp.* e *Cryptococcus spp.*

No intuito de melhorar a performance do método de referência CLSI M27-A2, o Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade (EUCAST) propôs algumas alterações ao documento do CLSI e, o Subcomitê de Testes de Susceptibilidade aos antifúngicos (AFST) desenvolveu o método que hoje é

chamado de EUCAST EDef 7.3. Apesar de ter como base o método de referência para microdiluição em caldo (documento M27-A2) ele incorpora algumas modificações, tais como automatização da técnica onde a leitura do perfil de resistência é realizada por espectrofotômetro; diminuição do período de incubação de 48 para 24 horas; adição de 2% de glicose que pode melhorar a interpretação dos resultados; um inóculo de células maior ( $0,5 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^5$  UFC/mL) e microplaca de 96 orifícios com fundo plano. Com relação à concordância com o método de referência vários trabalhos têm mostrado ótima correlação (Cuenca-Estrella et al., 2010; Rodriguez-Tudela et al., 2010).









### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Objetivo primário

Este estudo teve por objetivo caracterizar e avaliar a relação entre as espécies de *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal de mulheres com lesões causadas por HPV de alto risco para câncer do colo do útero.

#### 3.2 Objetivos secundário

- Analisar o perfil epidemiológico e sócio-demográfico das pacientes com lesões no colo uterino de alto e baixo grau;
- Avaliar a prevalência de *Candida spp.* Encontradas na mucosa oral e vaginal das mulheres com lesões por HPV;
- Identificar as espécies de *Candida spp.* da mucosa oral e vaginal das mulheres com lesões por HPV;
- Relacionar as leveduras do gênero *Candida* isoladas das pacientes com HPV de alto risco para câncer do colo do útero com lesões uterinas de alto grau (Grupo 1) e de baixo grau (Grupo 2);
- Determinar e comparar o perfil de sensibilidade “in vitro” aos antifúngicos, de todas as cepas isoladas, através do método de EUCAST frente a quatro fármacos.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Casuística

A casuística foi composta por 42 mulheres com HPV de alto risco para câncer do colo do útero, examinadas no período de maio a setembro de 2016, com média de idade de 36 anos  $\pm$  11,4, atendidas no Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior (PTGI), do Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP).

Os dados sobre HPV e lesões uterinas de alto e baixo grau foram obtidos a partir do prontuário médico das pacientes, além de informações sócio-demográficas a partir de um questionário apropriado (Anexo A). Através do questionário obtivemos dados epidemiológicos e sócio-demográficos das pacientes além de histórico da vida sexual e presença de sinais e sintomas característicos de infecção vaginal.

O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), número do parecer 1.484.248 (Anexo B) e Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo C). A participação das mulheres ocorreu mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo D). As mulheres participantes foram divididas em dois grupos:

- Grupo 1: Portadoras de HPV de alto risco para câncer do colo do útero e com lesões uterinas de alto grau, n=30.
- Grupo 2: Portadoras de HPV de alto risco para câncer de colo do útero e com lesões uterinas de baixo grau, n=12.

## 4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas mulheres grávidas, no período menstrual, ou não aceitaram em participar da pesquisa e/ou não assinaram o TCLE.

## 4.3 Critérios de inclusão

Para o grupo de estudo foram incluídas mulheres portadoras de lesão no colo uterino de alto grau (NIC II, III e carcinoma) e baixo grau (NIC I) para neoplasias e portadoras dos sorotipos de HPV de alto risco para o câncer do colo uterino e em acompanhamento no ambulatório de PTGI do HC-FMUSP.

## 4.4 Coleta do material

De cada participante, amostras de raspados da mucosa oral foram obtidos através de movimentos circulares na mucosa jugal com o auxílio de dois “swabs” estéreis e alginatados (Cefar®) e para a coleta da mucosa vaginal, foi necessário o auxílio de espéculo sem lubrificante para acesso à cavidade vaginal, e realizado dois raspados na parede lateral da cavidade vaginal com “swabs” estéreis e alginatados (Cefar®).

Em mucosa oral somente foram coletadas as amostras de secreção oral sem levar em consideração a presença de possíveis manifestações clínicas de infecção por *Candida spp.* Em mucosa vaginal, além da coleta das amostras de secreção vaginal, também foram anotados dados que indicavam a presença de sinais clínicos de infecção vaginal. Todas as coletas foram feitas em duplicata e realizadas pela mestrande Ana Clara de Souza (coleta da mucosa oral) e pela ginecologista Noely Paula Cristina Lorenzi (coleta da mucosa vaginal).

Após a coleta os materiais foram encaminhados para o Laboratório de Micologia do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro Oeste sob responsabilidade do Farmacêutico Prof. Dr. Marcos Ereno Auler, para incubação e realização dos testes. O material coletado foi semeado em meio ágar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de Cloranfenicol a 2% e em meio cromogênico (CHROMAGAR *Candida*®) para identificação presuntiva das leveduras.

#### **4.5 Identificação das leveduras isoladas**

As leveduras isoladas foram identificadas de acordo com os métodos preconizados por Kurtzman et. al. (2011), a partir dos seus aspectos macro e micromorfológicos, produção de tubo germinativo e pesquisa de clamidoconídeos. Também foi realizada a identificação por meio cromogênico.

##### **4.5.1 Caracterização macromorfológica**

Os aspectos macromorfológicos foram analisados em relação a sua coloração, formato das bordas e textura das colônias isoladas.

##### **4.5.2 Caracterização micromorfológica**

Para a caracterização micromorfológica foram realizadas provas de produção de tubo germinativo e pesquisa de clamidoconídios.

#### 4.5.2.1 Prova de produção de tubo germinativo

Este teste foi realizado para triar amostras de *C. albicans* e *C. dubliniensis* das demais leveduras. Para essa pesquisa, as amostras de leveduras foram cultivadas em ASD à 37°C por 48h. Uma alçada de cada amostra foi inoculada em tubos contendo 0,5 mL de soro fetal bovino (Cultilab®, Brasil), na escala<sup>3</sup> de McFarland.

As amostras foram mantidas por um período de 1 a 3 horas, em estufa bacteriológica a 35°C para verificar a formação do tubo germinativo. Em seguida, foi realizada a leitura a partir de uma alçada do conteúdo líquido acima descrito, colocando em lâmina de microscopia com lamínula e visualizando em microscópio óptico (40x). Foi considerada prova positiva nos casos em que ocorreu a formação de filamento fino e cilíndrico originado do blastoconídio da levedura com uma extensão sem constrição (Lacaz, 2002) (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Formação de tudo germinativo (seta) em amostras de *C. albicans*

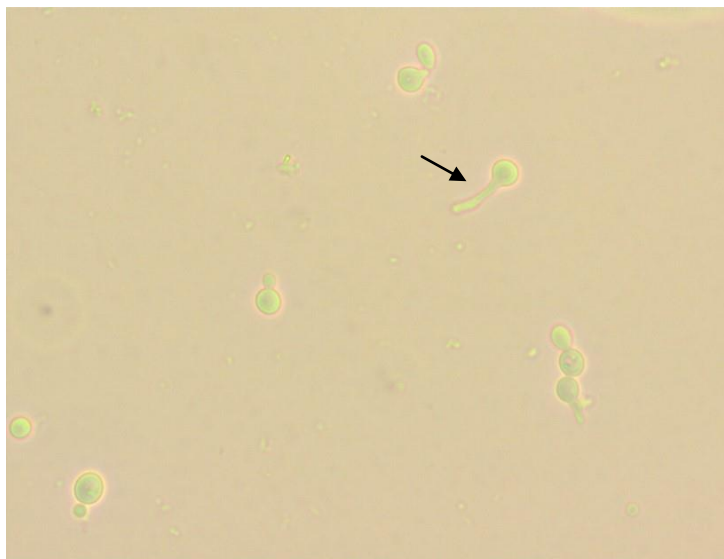


Foto cedida por: Dra. Luciana da Silva Ruiz, Instituto Adolfo Lutz – CLR II, Bauru/SP



#### 4.5.2.2 Microcultivo em ágar fubá

O microcultivo em ágar fubá foi utilizado para a observação da formação dos clamidoconídios, para isso as amostras isoladas foram repicadas em ASD e incubadas a 25°C por 24h. As colônias jovens foram subcultivadas em lâminas com meio de cultura ágar fubá acrescido de Tween 80, coberto por uma lamínula estéril, e incubado a 25°C, por até 96h. Foram pesquisadas em microscopia óptica, em objetivas de 10 e 40x, estruturas redondas de parede espessa, isoladas ou em cachos, na extremidade das pseudohifas. Os clamidoconídios terminais e intercalares são características de *C. albicans* (Figuras 4.2).

Figura 4.2 - Microcultivo em lâmina de *C. albicans*

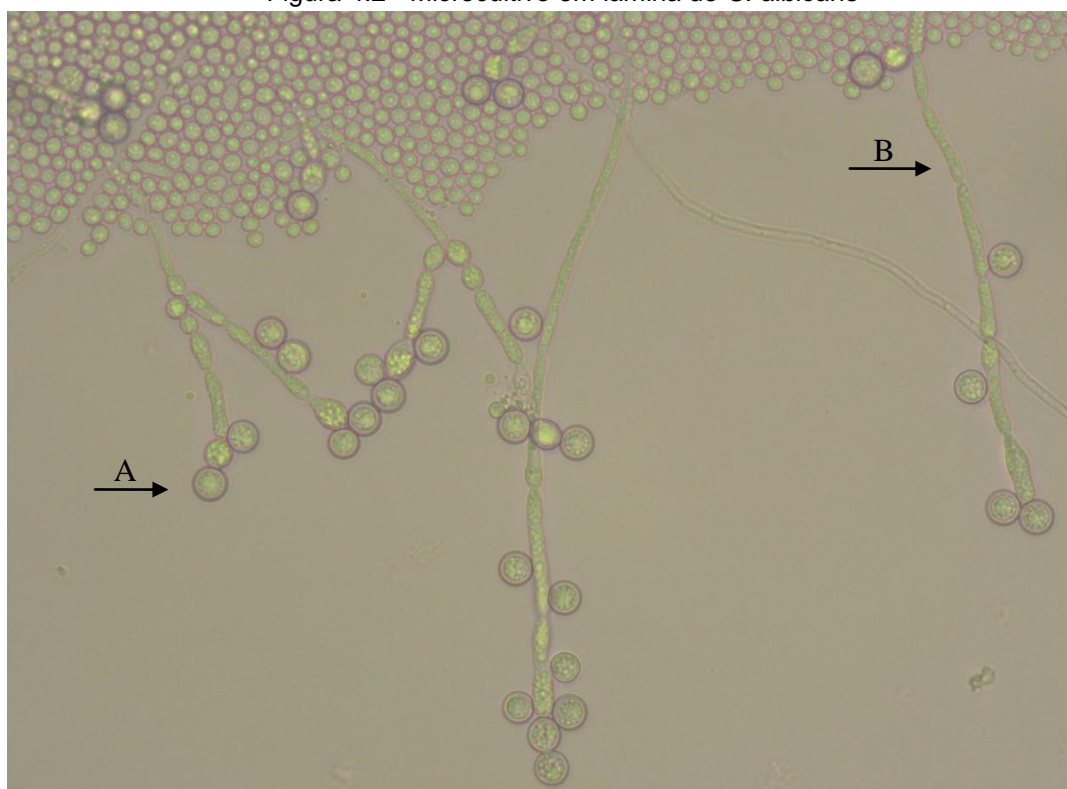


Foto cedida por: Dra. Luciana da Silva Ruiz, Instituto Adolfo Lutz– CLRII, Bauru/SP.

**A:** Clamidoconídios terminais em amostras de *C. albicans*.

**B:** Formação de pseudohifas em amostras de *C. albicans*.

#### 4.5.3 Semeadura em meio cromogênico

A técnica de semeadura em meio cromogênico é um método presuntivo de identificação de leveduras do gênero *Candida*. Para a realização deste teste foi realizada a semeadura por técnica de esgotamento, em meio “CHROMAGAR *Candida*®” e incubadas a 30°C por 48h.

A identificação presuntiva foi realizada de acordo com a pigmentação das leveduras, conforme a descrição do fabricante (CHROMAGAR *Candida*® Microbiology, BioMerieux, Paris, França), indicando que *Candida albicans* possui crescimento de coloração verde clara (Figura 5.2), *C. dubliniensis* verde escuro, *C. tropicalis* azul esverdeada a azul metalizado, *C. krusei* rosa claro com um contorno esbranquiçado e as demais espécies, adquirem coloração malva claro a escuro (rosa a violeta) ou, nos casos em que não é utilizado nenhum dos substratos cromogênicos, irão apresenta a sua cor natural (creme a branco).

#### 4.6 Perfil de sensibilidade aos antifúngicos

O teste escolhido como método de avaliação da sensibilidade das amostras isoladas frente aos antifúngicos foi a técnica de microdiluição segundo EUCAST - European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (Arendrup et al., 2015). Os antifúngicos utilizados foram anfotericina B, fluconazol, voriconazol e caspofungina.

Para a realização do ensaio foram utilizadas cepas padrão ATCC6258 (*Candida krusei*) e ATCC 22019 (*Candida parapsilosis*).

#### 4.6.1 Microdiluição – EUCAST

Esta metodologia segue os mesmos procedimentos do documento CLSI M27-A2 (2002), entretanto, apresenta algumas alterações em alguns pontos do procedimento, como descrito na revisão de literatura (item 2.6).

O meio de cultura utilizado foi o meio sintético RPMI-1640 em caldo com tampão MOPS (ácido 3[N-morfolino] propanosulfônico) 0,165 mol/L (Sigma), com L-glutamina, pH 7.0 (com indicador vermelho de fenol) suplementado com 2% de glicose.

A partir dos repiques de 24h, foram preparadas suspensões em salina 0,145mol/L de NaCl, estéril padronizadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland (bioMérieux), com aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  células/mL. Estas suspensões foram agitadas em vórtex durante 15 segundos e a densidade celular entre os inóculos foi definida por espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530 nm. A partir desse inóculo foi realizada uma diluição 1:10 em meio de cultura RPMI 1640 com 2% de glicose. A concentração de células inoculada nas placas foi de  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  UFC/mL de acordo com recomendações do documento EUCAST E.def.7.3 (Arendrup et al., 2015); resultando em uma concentração final de células (droga + inóculo) de  $0,5 \times 10^5$  a  $2,5 \times 10^5$  (células/mL).

A leitura do teste de microdiluição em placa foi realizada por aparelho espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm. Antes da realização da leitura, todas as placas foram agitadas por 5 min a 60rpm para obter uma suspensão homogênea de células no fundo da placa.

A interpretação dos resultados foi baseada nos valores preconizados pelo documento EUCAST E.def.7.3 (Arendrup et al., 2015). Como os valores para equinocandinas não são estabelecidos pelo EUCAST, os valores utilizados neste estudo foram baseados no estudo de Romero et al. (2004), assim como os valores para Voriconazol em relação a *C. glabrata*. Os valores utilizados neste estudo para as espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* podem ser observados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Interpretação do comportamento de cepas de leveduras frente à concentração dos antifúngicos ( $\mu\text{g/mL}$ )

|                             | Anf        |         | Flu            |          | Vor           |            | Cas           |          |
|-----------------------------|------------|---------|----------------|----------|---------------|------------|---------------|----------|
|                             | S          | R       | S              | R        | S             | R          | S             | R        |
| <b><i>C. albicans</i></b>   | $\leq 1^a$ | $> 1^a$ | $\leq 2^a$     | $> 4^a$  | $\leq 0,12^a$ | $> 0,12^a$ | $\leq 0,12^b$ | $> 64^b$ |
| <b><i>C. glabrata</i></b>   | $\leq 1^a$ | $> 1^a$ | $\leq 0,002^a$ | $> 32^a$ | $\leq 0,25^b$ | $> 0,25^b$ | $\leq 0,25^b$ | $> 32^b$ |
| <b><i>C. tropicalis</i></b> | $\leq 1^a$ | $> 1^a$ | $\leq 2^a$     | $> 4^a$  | $\leq 0,12^a$ | $> 0,12^a$ | $\leq 0,12^b$ | $> 64^b$ |

S: sensível; R: resistente; Anf: anfotericina B; Flu: fluconazol; Vor: voriconazol; Cas: caspofungina.

Fonte: <sup>a</sup>Documento EUCAST E.def.7.3 (Arendrup et al., 2015) e <sup>b</sup>Romero et al. (2004).

#### 4.7 Análise Estatística

Inicialmente foi realizada a estatística descritiva das variáveis sócio-demográficas, hábitos pessoais e dados clínicos. Para a comparação entre os grupos de estudo de pacientes com lesões em colo uterino de alto e baixo grau foi avaliada quanto à sua associação com prevalência de cultura positiva para *Candida spp.* em secreção oral e vaginal, características socioeconômicas, aspectos comportamentais e clínicos das pacientes foi utilizado o programa STATA 13.1.

Cada variável independente foi avaliada isoladamente, resultando a razão de chance (*odds ratio*), nível de significância (95%), como medida de associação.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Casuística

A média de idade do Grupo 1 foi de 36,5 anos  $\pm$  11,10 com peso médio de 66,38 Kg  $\pm$  15,0 e do Grupo 2 média de idade de 34,75 anos  $\pm$  15,5 e peso médio de 59,05 Kg  $\pm$  2,82.

### 5.2 Doenças crônicas e sinais clínicos de infecção vaginal

As doenças crônicas relatadas em ambos os Grupos foram *diabetes mellitus*, lúpus, infecção por HIV e linfopenia, sendo que no Grupo 1 três pacientes eram diabéticas, duas lúpicas e duas eram portadoras do HIV e no Grupo 2, uma era diabética, uma lúpica, duas portadoras do HIV e uma com linfopênica, como pode ser observado no gráfico 5.1. Destas 12 pacientes com doenças crônicas, cinco (42%) apresentaram cultura positiva para *Candida spp.* em mucosa oral e sete (58%) apresentaram cultura positiva para *Candida spp.* em mucosa vaginal, o que pode ser observado nas tabelas 5.1 e 5.2 abaixo.

Tabela 5.1: Relação entre a presença de doenças crônicas e cultura positiva para *Candida spp.* em mucosa vaginal.

|                                 | Com doença crônica | Sem doença crônica | Total |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|-------|
| <b>Cultura Vaginal Positiva</b> | 7                  | 5                  | 12    |
| <b>Cultura Vaginal Negativa</b> | 5                  | 25                 | 30    |
| <b>Total</b>                    | 12                 | 30                 | 42    |

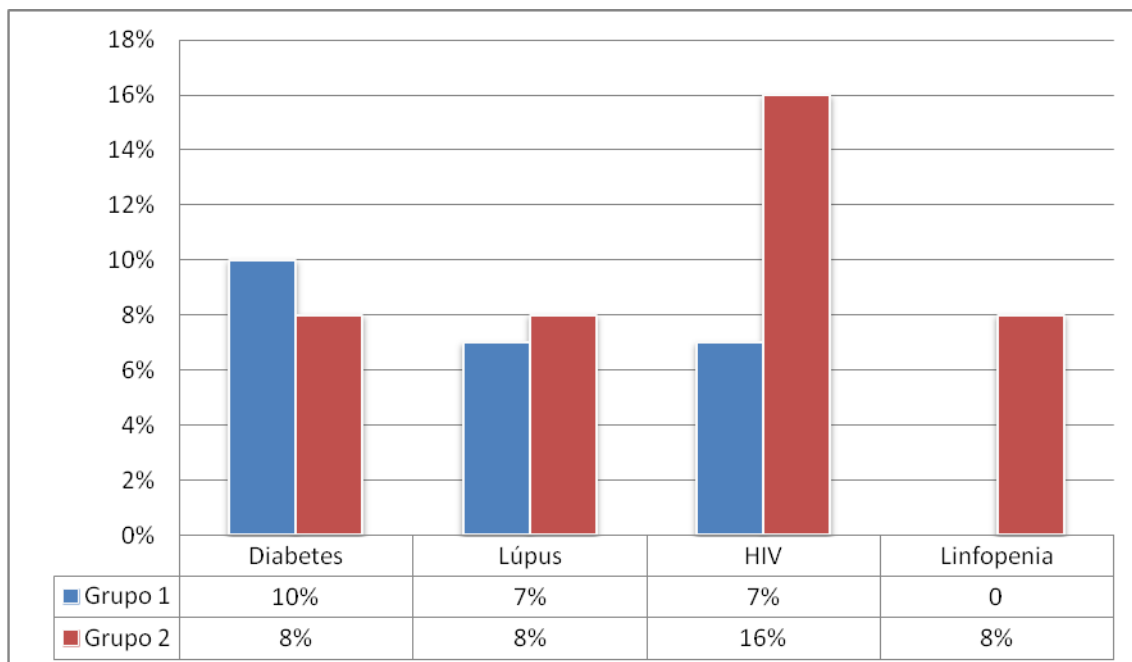
Sensibilidade: 58,3%; Especificidade: 83,3%

Tabela 5.2: Relação entre a presença de doenças crônicas e cultura positiva para *Candida spp.* em mucosa oral.

|                              | Com doença crônica | Sem doença crônica | Total |
|------------------------------|--------------------|--------------------|-------|
| <b>Cultura oral positiva</b> | 5                  | 4                  | 9     |
| <b>Cultura oral negativa</b> | 7                  | 26                 | 33    |
| <b>Total</b>                 | 12                 | 30                 | 42    |

Sensibilidade: 41,6%; Especificidade: 86,6%.

Gráfico 5.1 - Prevalência de doenças crônicas nos dois grupos de pacientes com HPV de alto risco para câncer do colo do útero



Durante a coleta foram evidenciados sinais clínicos indicativos de candidíase vulvovaginal em 23% (7/30) das pacientes do Grupo 1 e 17% (2/12) no Grupo 2. Sendo que das nove pacientes com sinais clínicos positivos para infecção vulvovaginal somente duas apresentaram cultura positiva para *Candida spp.*, como pode ser observado na tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Relação entre presença de sinais clínicos para infecção vulvovaginal e cultura positiva para *Candida spp.*

|                         | Sinais clínicos positivos | Sinais clínicos negativos | Total |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|
| <b>Cultura positiva</b> | 2                         | 10                        | 12    |
| <b>Cultura negativa</b> | 7                         | 23                        | 30    |
| <b>Total</b>            | 9                         | 33                        | 42    |

Sensibilidade: 22,2%; Especificidade: 69,7%.

### 5.3 Correlação entre dados sócio-demográficos, culturais e clínicos das pacientes com lesões uterinas de alto e baixo grau

Na associação entre lesões uterinas de alto e baixo grau com informações sócio-demográficas (Tabela 5.4), culturais (Tabela 5.5), hábitos (Tabela 5.6) não apresentaram diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ).

Tabela 5.4 - Associação entre lesões de alto e baixo grau com informações sócio-demográficas das pacientes

| Variável            | Categoria                    | G1 | G2 | Odds ratio | Valor de <i>p</i>  |
|---------------------|------------------------------|----|----|------------|--------------------|
| <b>Idade</b>        | Mais de 40 anos              | 11 | 3  | 1,737      | 0,469 <sup>b</sup> |
|                     | Menos de 40 anos             | 19 | 9  | 1          | 1                  |
| <b>IMC</b>          | Obesidade                    | 13 | 4  | 1,529      | 0,551 <sup>b</sup> |
|                     | Peso ideal                   | 17 | 8  | 1          | 1                  |
| <b>Estado civil</b> | Solteira                     | 13 | 6  | 0,764      | 0,695 <sup>b</sup> |
|                     | Casada                       | 17 | 6  | 1          | 1                  |
| <b>Escolaridade</b> | Fundamental/médio            | 26 | 9  | 2,167      | 0,359 <sup>b</sup> |
|                     | Superior                     | 4  | 3  | 1          | 1                  |
| <b>Renda mensal</b> | Menos que 2 salários mínimos | 17 | 8  | 0,653      | 0,551 <sup>b</sup> |
|                     | Mas que 2Salários mínimos    | 13 | 4  | 1          | 1                  |

<sup>a</sup>valor de  $p<0,05$ , com diferença estatística significativa

<sup>b</sup>valor de  $p>0,05$ , sem diferença estatística significativa.

**IMC:** índice de Massa Corporal.

Tabela 5.5 - Associação entre lesões de alto e baixo grau com informações culturais das pacientes

| Variável                                 | Categoria            | G1 | G2 | Odds ratio | Valor de <i>p</i>  |
|--|----------------------|----|----|------------|--------------------|
| <b>Menarca</b>                           | Com 15 anos ou menos | 25 | 10 | 1          | 1 <sup>b</sup>     |
|  | Com mais de 15 anos  | 5  | 2  | 1          | 1                  |
| <b>Coitarca</b>                          | Com 15 anos ou menos | 9  | 2  | 2,142      | 0,374 <sup>b</sup> |
|  | Mais que 1           | 7  | 1  | 3,348      | 0,264              |
| <b>Número de parceiros no último ano</b> | 1 ou nenhum          | 23 | 11 | 1          | 1                  |
|  | Não                  | 17 | 8  | 0,654      | 0,551 <sup>b</sup> |
| <b>Uso de camisinha</b>                  | Sim                  | 13 | 4  | 1          | 1                  |
|  | Não                  | 14 | 8  | 0,437      | 0,241 <sup>b</sup> |
| <b>Outro MAC</b>                         | Sim                  | 16 | 4  | 1          | 1                  |

<sup>a</sup>valor de  $p < 0,05$ , com diferença estatística significativa;

<sup>b</sup>valor de  $p > 0,05$ , sem diferença estatística significativa.

**MAC:** método anticoncepcional.

Tabela 5.6 - Associação entre lesões de alto e baixo grau com hábitos das pacientes

| Variável               | Categoria | G1 | G2 | Odds ratio | Valor de <i>p</i>  |
|------------------------|-----------|----|----|------------|--------------------|
| <b>Tabagismo</b>       | Não       | 8  | 2  | 1,818      | 0,492 <sup>b</sup> |
|                        | Sim       | 22 | 10 | 1          | 1                  |
| <b>Álcool</b>          | Não       | 11 | 1  | 6,368      | 0,066 <sup>b</sup> |
|                        | Sim       | 19 | 11 | 1          | 1                  |
| <b>Roupa íntima</b>    | Tanto faz | 14 | 4  | 1,75       | 0,430 <sup>b</sup> |
|                        | Algodão   | 16 | 8  | 1          | 1                  |
| <b>Sabonete íntimo</b> | Sim       | 10 | 5  | 0,7        | 0,610 <sup>b</sup> |
|                        | Não       | 20 | 7  | 1          | 1                  |

<sup>a</sup>valor de  $p < 0,05$ , com diferença estatística significativa;

<sup>b</sup>valor de  $p > 0,05$ , sem diferença estatística significativa.

Na correlação dos dados clínicos das pacientes com lesão de baixo grau (Tabela 5.6) mostrou que houve diferença estatística significante entre a presença de lesões no colo uterino com a presença de doenças crônicas ( $p < 0,05$ ).



Tabela 5.7 - Associação entre lesões de alto e baixo grau com informações clínicas das pacientes

| Variável                  | Categoria      | G1 | G2 | Odds ratio | Valor de <i>p</i>  |
|---------------------------|----------------|----|----|------------|--------------------|
| <b>Outra DST</b>          | SIM            | 4  | 2  | 0,769      | 0,780 <sup>b</sup> |
|                           | Não            | 26 | 10 | 1          | 1                  |
| <b>Doenças crônicas</b>   | Sim            | 10 | 9  | 0,167      | 0,014 <sup>a</sup> |
|                           | Não            | 20 | 3  | 1          | 1                  |
| <b>Uso de antibiótico</b> | Menos de 1 mês | 3  | 2  | 0,556      | 0,547 <sup>b</sup> |
|                           | Mais de 1 mês  | 27 | 10 | 1          | 1                  |
| <b>Sintomas de CVV</b>    | Sim            | 23 | 8  | 1,642      | 0,505 <sup>b</sup> |
|                           | Não            | 7  | 4  | 1          | 1                  |
| <b>Sinais de CVV</b>      | Sim            | 6  | 3  | 0,75       | 0,721 <sup>b</sup> |
|                           | Não            | 24 | 9  | 1          | 1                  |

<sup>a</sup>valor de  $p < 0,05$ , com diferença estatística significativa;

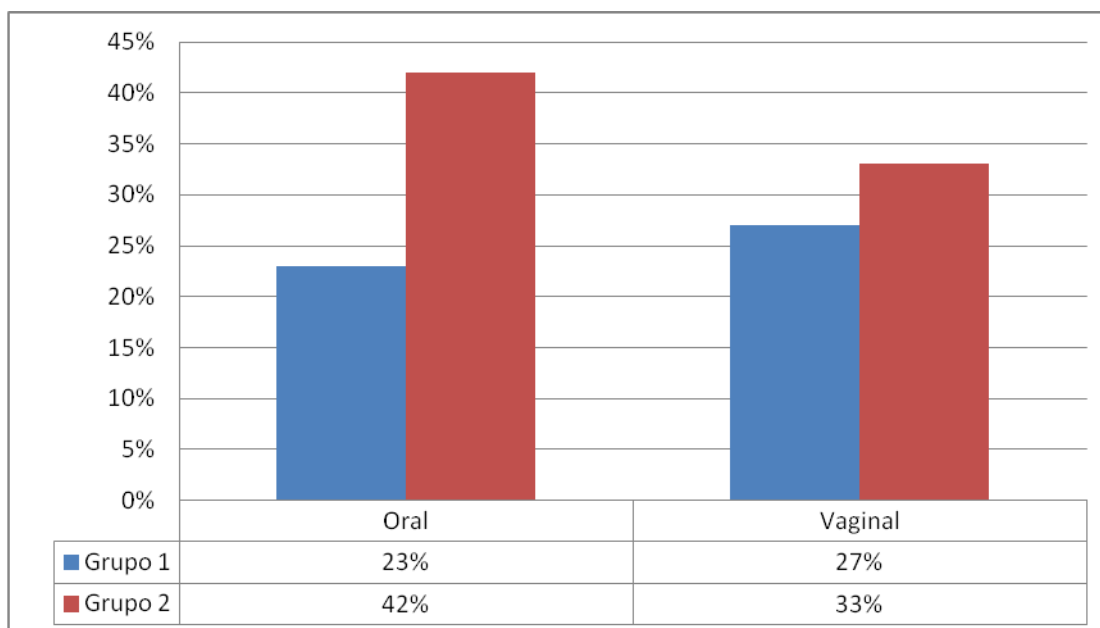
<sup>b</sup>valor de  $p > 0,05$ , sem diferença estatística significativa.

**DST:** Doença Sexualmente Transmissível; **CVV:** Candidíase Vulvovaginal.

#### 5.4 Colonização oral e vaginal por *Candida spp.*

Da coleta microbiológica para verificação de colonização oral por *Candida spp.* do Grupo 1 mostrou cultura positiva em 23% das amostras e em mucosa vaginal 27% de positividade para cultura de *Candida spp.* No Grupo 2 houve positividade de 42% para cultura de *Candida spp.* de mucosa oral e em 33% em mucosa vaginal (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 - Positividade de cultura para *Candida albicans* em mucosas oral e vaginal nos Grupos 1 e 2



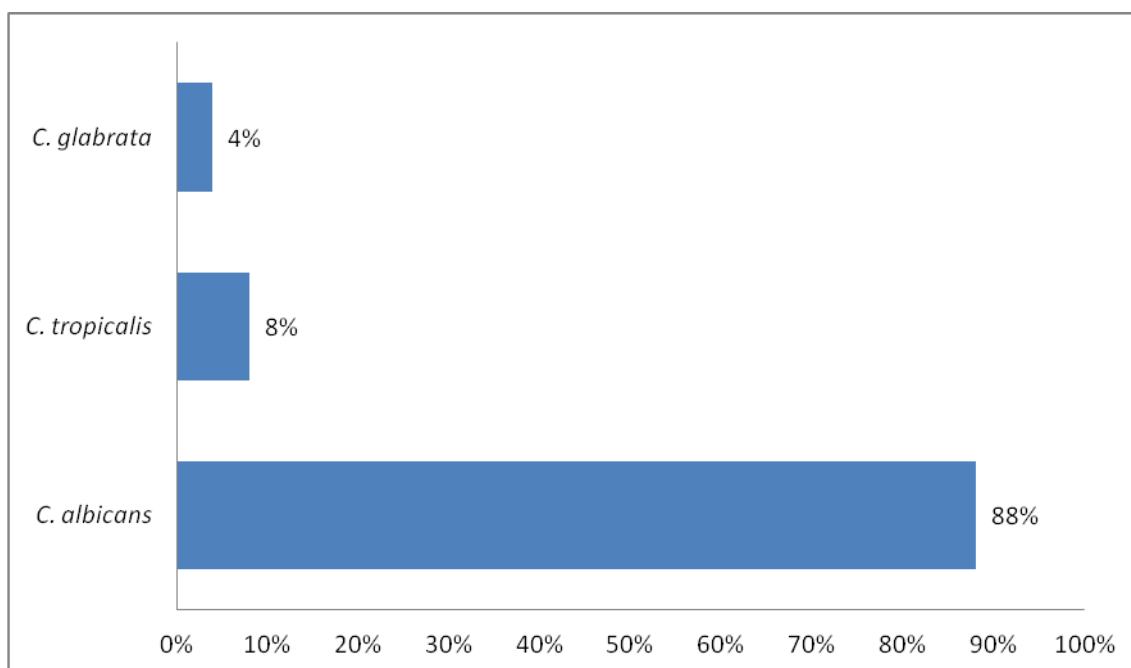
Em relação a comparação de positividade em mucosa oral e vaginal, 18 pacientes apresentaram positividade, sendo 6 em secreção oral (6/18), 6 em secreção vaginal (6/18) e 6 em ambas (6/18), sendo que no Grupo 1 quatro pacientes apresentaram positividade em ambas as mucosas e no Grupo 2 duas pacientes apresentaram positividade em ambas as mucosas.

### 5.5 Identificação das leveduras isoladas

Das 24 amostras de leveduras isoladas, a espécie mais frequente foi *Candida albicans* com 88% (21/24), seguido de *Candida tropicalis* com 8% (2/24) e 4% de *Candida glabrata* (1/24).

A frequência das diferentes espécies de *Candida* isolada das mucosas oral e vaginal das pacientes do G1 e G2 é mostrada no Gráfico 5.3.

Gráfico 5.3–Prevalência das espécies de *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal das pacientes dos Grupos 1 e 2



### 5.5.1 Caracterização macromorfológica

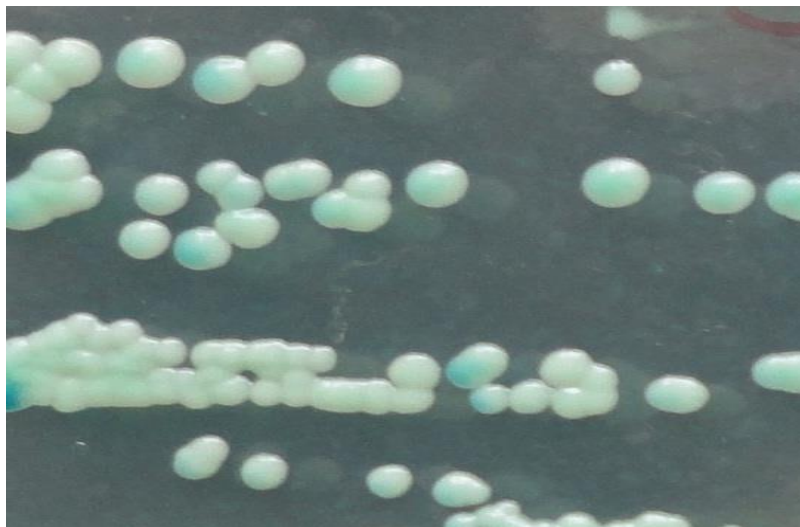
Em ASD as espécies de *Candida* apresentaram coloração que variaram de branca a creme, com textura de lisa a rugosa e bordas regulares ou irregulares. A figura 5.1 ilustra a macromorfologia da *Candida albicans* que apresentou coloração creme, superfície lisa e bordas regulares.

Figura 5.1 -Cultivo de *Candida albicans* em ágar Sabouraud dextrose



No meio cromogênico as amostras do Grupo 1 e 2 em secreção oral e vaginal apresentaram coloração verde claro sugestivo de *C. albicans*, magenta sugestivo de *C. krusei* e rosa e branca sugestivo de *Candida spp.* A figura5.2 ilustra a imagem sugestiva de *C. albicans*.

Figura 5.2 - Cultivo de *C. albicans* em meio cromogênico



## 5.5.2 Caracterização micromorfológica

### 5.5.2.1 Prova de produção de tubo germinativo

A formação do tubo germinativo, característica da espécie *C. albicans* e *C. dubliniensis*, foi positiva 88% (21/24) das cepas isoladas. A figura 4.1 apresenta a formação de tubo germinativo em amostra de *Candida albicans*.

### 5.5.2.2 Microcultivo em ágar fubá

Classificados em blastoconídios pequenos ou globosos, agrupados, presença ou ausência de hifas, e presença ou ausência de clamidoconídios, as figuras 4.2 e 5.3 mostram as diferenças entre a micromorfologia dos isolados identificados como *Candida spp.* Na *Candida albicans* foi observado a presença de pseudo-hifas e clamidoconídios (Figura 4.2). Em *Candida glabrata* não é observada a presença de hifas (Figura 5.3).

Figura 5.3-Microcultivo em lâmina de *C. glabrata*



Em relação aos métodos de identificação, tradicional e cromogênico, das espécies do gênero *Candida*, observou-se uma baixa concordância, como pode ser observado na tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Relação de culturas positivas para *Candida spp.* em mucosas oral e vaginal, de pacientes dos grupos 1 e 2, e as espécies envolvidas

| Grupos | Paciente | Mucosa Oral          |                    | Mucosa Vaginal       |                      |
|--------|----------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
|        |          | Método tradicional   | Método cromogênico | Método tradicional   | Método cromogênico   |
| G1     | P1       | <i>C. albicans</i>   | Verde              | <i>C. albicans</i>   | Verde                |
|        | P2       | <i>C. albicans</i>   | Verde              | Negativo             | Negativo             |
|        | P3       | <i>C. albicans</i>   | Roxo               | <i>C. albicans</i>   | Roxo                 |
|        | P4       | <i>C. albicans</i>   | Verde              | <i>C. albicans</i>   | Verde                |
|        | P5       | <i>C. albicans</i>   | Verde              | Negativo             | Negativo             |
|        | P6       | <i>C. albicans</i>   | Negativo           | Negativo             | Negativo             |
|        | P7       | Negativo             | Negativo           | <i>C. albicans</i>   | Branco               |
|        | P8       | Negativo             | Negativo           | <i>C. glabrata</i>   | Roxo                 |
|        | P9       | Negativo             | Negativo           | <i>C. albicans</i>   | Negativo             |
|        | P10      | <i>C. albicans</i>   | Verde              | <i>C. albicans</i>   | Roxo                 |
|        | P11      | Negativo             | Negativo           | <i>C. albicans</i>   | Verde                |
| G2     | P1       | <i>C. tropicalis</i> | Cinza              | <i>C. albicans</i>   | Verde                |
|        | P2       | <i>C. albicans</i>   | Verde              | Negativo             | Negativo             |
|        | P3       | <i>C. albicans</i>   | Verde              | Negativo             | Negativo             |
|        | P4       | <i>C. albicans</i>   | Verde              | Negativo             | Negativo             |
|        | P5       | Negativo             | Negativo           | <i>C. tropicalis</i> | Branco com meio roxo |
|        | P6       | <i>C. albicans</i>   | Verde              | <i>C. albicans</i>   | Verde                |
|        | P7       | Negativo             | Negativo           | <i>C. albicans</i>   | Rosa                 |

Negativo: não houve crescimento; Verde: *C. albicans*; Roxo: *Candida spp.*; Cinza: *Candida spp.*; Rosa: *Candida spp.*; Branco com meio roxo: *C. krusei*.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de lesões no colo uterino com a cultura positiva para *Candida spp.* em mucosa oral ( $p < 0,05$ ). Em relação a mucosa vaginal, apesar da positividade de algumas culturas, este dado não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos, como pode ser observado na tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Associação entre lesões de alto e baixo grau com a cultura para *Candida spp.* de mucosas oral e vaginal

| Variável               | Categoria | G1 | G2 | Odds ratio | Valor de <i>p</i>  |
|------------------------|-----------|----|----|------------|--------------------|
| <b>Cultura Oral</b>    | Positiva  | 7  | 5  | 0,426      | 0,235 <sup>a</sup> |
|                        | Negativa  | 23 | 7  | 1          | 1                  |
| <b>Cultura Vaginal</b> | Positiva  | 8  | 4  | 0,727      | 0,666 <sup>a</sup> |
|                        | Negativa  | 22 | 8  | 1          | 1                  |

<sup>a</sup>valor de  $p > 0,05$ , sem diferença estatisticamente significativa.

## 5.6 Perfil de sensibilidade aos antifúngicos

Por meio do teste de microdiluição EUCAST, as cepas isoladas tiveram o seu perfil de sensibilidade antifúngica traçados frente a quatro antifúngicos, Anfotericina B (Anf), Fluconazol (Flu), Voriconazol (Vor) e Caspofungina (Cas) como pode ser observado na tabela 5.10.

As cepas de *C. albicans* apresentaram sensibilidade a todos os antifúngicos testados. Entretanto a cepa de *C. glabrata* apresentou um valor intermediário (8 µg/mL) entre os valores de sensibilidade e resistência ao antifúngico fluconazol, não estando de acordo com o documento EUCAST Edef 7.3. E uma cepa de *Candida tropicalis* apresentou resistência ao fluconazol.

As variações de CIM (µg/mL) para anfotericina B foram de 0,0012 até 0,5, para fluconazol foram de 0,12 até 8; para voriconazol foi de 0,012 até 0,06 e para caspofungina de 0,03 a 0,5.

Tabela 5.10 - Resultados do CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos por teste de microdiluição com leveduras isoladas das mucosas oral e vaginal das pacientes com lesões uterinas de alto grau (Grupo 1) e de baixo grau (Grupo 2)

| Grupo                       | Sítio/Espécies<br>(n)/Antifúngicos | % de           |                | Variações     | CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) |        |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------|----------------|---------------|--------------------------|--------|
|                             |                                    | S <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> |               | CIM 50                   | CIM 90 |
| <b>MUCOSA ORAL</b>          |                                    |                |                |               |                          |        |
| <i>C. albicans</i> (n=07)   |                                    |                |                |               |                          |        |
| <b>G1</b>                   | Anfotericina B                     | 100            | -              | 0.03 – 0.25   | 0.090                    | 0.210  |
|                             | Fluconazol                         | 100            | -              | 0.12 - 2      | 0.185                    | 0.775  |
|                             | Voriconazol                        | 100            | -              | 0.015 – 0.06  | ND <sup>3</sup>          | 0.028  |
|                             | Caspofungina                       | 100            | -              | 0.03 – 0.06   | ND                       | 0.053  |
| <i>C. albicans</i> (n=04)   |                                    |                |                |               |                          |        |
| <b>G2</b>                   | Anfotericina B                     | 100            | -              | 0.06 – 0.25   | 0.015                    | 0.198  |
|                             | Fluconazol                         | 100            | -              | 0.12 - 2      | 0.120                    | 1.300  |
|                             | Voriconazol                        | 100            | -              | 0.015 – 0.06  | ND                       | 0.042  |
|                             | Caspofungina                       | 100            | -              | 0.03          | ND                       | ND     |
| <i>C. tropicalis</i> (n=01) |                                    |                |                |               |                          |        |
|                             | Anfotericina B                     | 100            | -              | 0.03          | ND                       | ND     |
|                             | Fluconazol                         | 100            | -              | 0.5           | ND                       | ND     |
|                             | Voriconazol                        | 100            | -              | 0.015         | ND                       | ND     |
|                             | Caspofungina                       | 100            | -              | 0.03          | ND                       | ND     |
| <b>MUCOSA VAGINAL</b>       |                                    |                |                |               |                          |        |
| <i>C. albicans</i> (n=07)   |                                    |                |                |               |                          |        |
| <b>G1</b>                   | Anfotericina B                     | 100            | -              | 0.25 – 0.5    | ND                       | 0.412  |
|                             | Fluconazol                         | 100            | -              | 0.25 – 0.5    | ND                       | 0.412  |
|                             | Voriconazol                        | 100            | -              | 0.012 – 0.015 | 0.013                    | 0.015  |
|                             | Caspofungina                       | 100            | -              | 0.03 – 0.5    | ND                       | 0.185  |
| <i>C. glabrata</i> (n=01)   |                                    |                |                |               |                          |        |
|                             | Anfotericina B                     | 100            | -              | 0.25          | ND                       | ND     |
|                             | Fluconazol                         | -              | 100            | 8             | ND                       | ND     |
|                             | Voriconazol                        | 100            | -              | 0.12          | ND                       | ND     |
|                             | Caspofungina                       | 100            | -              | 0.12          | ND                       | ND     |
| <i>C. albicans</i> (n=03)   |                                    |                |                |               |                          |        |
| <b>G2</b>                   | Anfotericina B                     | 100            | -              | 0.25 – 0.5    | ND                       | 0.425  |
|                             | Fluconazol                         | 100            | -              | 0.25 – 0.5    | ND                       | 0.425  |
|                             | Voriconazol                        | 100            | -              | 0.012 – 0.015 | 0.012                    | 0.014  |
|                             | Caspofungina                       | 100            | -              | 0.03 – 0.5    | ND                       | 0.359  |
| <i>C. tropicalis</i> (n=01) |                                    |                |                |               |                          |        |
|                             | Anfotericina B                     | 100            | -              | 0.012         | ND                       | ND     |
|                             | Fluconazol                         | -              | 100            | 8             | ND                       | ND     |
|                             | Voriconazol                        | 100            | -              | 0.12          | ND                       | ND     |
|                             | Caspofungina                       | 100            | -              | 0.06          | ND                       | ND     |

<sup>1</sup>Sensível; <sup>2</sup>Resistente; <sup>3</sup>Não determinado;

CIM<sub>50</sub>: Concentração mínima para inibir 50% das leveduras;

CIM<sub>90</sub>: Concentração mínima para inibir 90% das leveduras.



## 6 DISCUSSÃO

A média de idade das participantes com HPV de alto risco para câncer do colo do útero estudada foi de 36 anos  $\pm$  11,4, um pouco acima dos dados encontrados em outros estudos (Silva et al., 2014; Coser et al., 2016; Shaw et al., 2016) que variaram de 28,52 a 33,9 anos, e de acordo com Coser et al. (2016) em que a idade das pacientes, por ser menor que a nossa, foi relacionada com uma vida sexual mais ativa, e ter múltiplos parceiros o que aumentariam os riscos de infecções sexualmente transmissíveis.

Entre os fatores sócio demográficos estudados em nosso estudo não se observou associação estatisticamente significativa com o HPV, fato que difere do estudo de Coser et al. (2016) no qual, não ser casada e possuir uma renda abaixo de um salário mínimo, indicou uma associação estatisticamente significativa com a presença de HPV.

Em relação aos fatores comportamentais, no estudo realizado por Coser et al. (2016) a idade da primeira relação sexual e número de parceiros sexuais não apresentaram associação com a infecção por HPV, fato este que corrobora com nossos resultados, visto também que não houve associação estatisticamente significativa. Já no estudo realizado por Silva et al. (2014) possuir apenas um parceiro sexual foi associado como fator de proteção de evolução para lesão de alto grau causada por HPV.

Outros dados comportamentais que foram observados neste estudo, como o uso de outros métodos contraceptivos não apresentou associação estatisticamente significativa. Mas, segundo o estudo realizado por Shaw et al. (2016) houve associação estatisticamente significativa com o uso de camisinha e a presença de HPV, diferente deste estudo e de Coser et al. (2016). Manhart; Koutsky, em 2002, indicaram que apesar da proteção contra verrugas genitais, o uso da camisinha não previne a infecção por HPV, o que pode ser sugestivo do não uso do preservativo em todas as relações sexuais, e consequente infecção pelo vírus.

Já o uso do DIU, segundo alguns estudos possui associação protetora para infecção por HPV, o que pode ser explicado através da alta resposta imune gerada pelo DIU no colo uterino gerando uma rápida eliminação de infecções (Ortiz; Croxatto, 2007). Por outro lado, outros estudos tem demonstrado que infecções crônicas podem promover o desenvolvimento de lesões pré-malignas de alto risco relacionadas ao HPV (Fernandes et al, 2015). No estudo de Silva et al. (2014) o uso de anticoncepcional hormonal foi associado como fator de proteção para progressão da lesão uterina por HPV. Entretanto, Roset Bahmanyar et al. (2012) indicaram que o uso prolongado de anticoncepcional hormonal é associado a um maior risco de infecção por HPV, o mecanismo biológico que explicaria essa relação é o aumento da hidroxilação do estradiol em células cervicais infectadas por tipos oncogênicos de HPV, que por sua vez induz maior transcrição de agentes oncogênicos.

Dentre os hábitos avaliados das pacientes não houve associação positiva em relação ao HPV. Segundo Coser et al. (2016) que avaliou a associação entre tabagismo e HPV, também não houve associação. Já no trabalho realizado por Silva et al. (2014) o tabagismo foi associado como fator de risco para infecção por HPV.

Em relação as informações clínicas das pacientes, o nosso estudo não encontrou associação com presença de outras IST's, uso de antibióticos ou sinais e sintomas de candidíase vulvovaginal.

No estudo realizado por Coser et al. (2016) também não apresentou associação entre presença de outras IST's ou outras infecções vaginais concomitantes, com a infecção por HPV. O mesmo pode ser observado no estudo realizado por Shaw et al. (2016). No estudo de Silva et al. (2014) infecções vaginais por *Candida spp.*, *Trichomonas vaginalis*, ou por bactérias foram associadas como fator de proteção para progressão de lesões uterinas de alto grau, causadas por HPV. Apesar de Rodriguez-Cerdeira et al. (2012) não indicarem associação entre infecção por *Candida spp.*, houve uma associação entre *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis* com alguns tipos de HPV. Entretanto um fato que deve ser observado é a forma de pesquisa de fungos em mucosa vaginal, visto que o papanicolaou não é o

exame indicado para este tipo de diagnóstico, assim, pode haver algum viés nestes estudos se algum autor utilizou esta metodologia para fazer o diagnóstico para infecções fúngicas.

Segundo a análise estatística deste estudo, em relação a presença de doenças crônicas, existe 83% menos chance de ocorrer em pacientes com lesão em colo uterino de alto grau do que em pacientes com lesão de baixo grau, fato este que não pode ser corroborado ou explicado por outros estudos, principalmente pelo fato de que como estas participantes apresentavam doenças sistêmicas que alteravam a imunidade era esperado que a presença destas aumentassem a chance do vírus progredir para lesões mais graves.

A relação entre a presença de doenças crônicas em cultura positiva para *Candida spp.* em mucosa vaginal e oral indicou uma baixa sensibilidade o que significa a presença de casos falso-negativos.

Um estudo realizado por Castro-Silva et al. (2012) observou que a prática de sexo oral é muito comum e que o uso de preservativo é quase nulo, o que aumenta a forma de transmissão de várias doenças consideradas como sexualmente transmissíveis, como por exemplo, a candidíase e o HPV.

Candidíase vulvovaginal é uma infecção que acomete cerca de 70-75% das mulheres em idade fértil. É estimado que deste total, 40-50% apresentarão casos de recidivas sendo que em torno de 5 a 15% irão tornar-se recorrentes (Medeiros, 2013; Cassone, 2015). O agente causador destas infecções é a *Candida spp.* considerada uma levedura comensal que faz parte da microbiota normal humana e, sob certas circunstâncias, pode tornar-se patogênica (Lott et al., 2003). *Candida albicans* é a espécie de maior incidência nestas infecções, neste estudo a proporção observada desta espécie (88%) ficou acima da média da prevalência mundial (65,3%) e da Europeia (67,9%) segundo dados reportados por Pfaller et al. (2010).

Das 12 pacientes que apresentaram cultura positiva para *Candida spp.* apenas 17% apresentaram sinais clínicos, sendo que a falta destes sinais clínicos pode indicar colonização vaginal por *Candida spp.* Das 30 pacientes com cultura vaginal negativa para *Candida spp.*, 23% apresentaram sinais

clínicos positivos o que pode indicar infecção por bactérias, entretanto a sensibilidade desta avaliação foi baixa indicando a presença de casos falso-negativos. Em estudo realizado por Brandolt et al. (2016) a prevalência de Candidíase vulvovaginal em pacientes assintomáticas foi de 13,3%. Já Bassayouni et al. (2015) encontraram 20% de positividade em pacientes saudáveis.

Inflamações recorrentes facilitam a proliferação celular, ajudam no crescimento de células malignas, liberam citocinas, quimiocinas, radicais livres, entre outros fatores, o que indica que em uma paciente com microbiota anormal podem ocorrer mais alterações celulares do que em pacientes com microbiota normal (Moss; Blaser, 2005; Daí et al., 2010; Roeters et al., 2010). Um exemplo deste fato seriam casos de candidíase vulvovaginal recorrente devido a alta patogenicidade de *Candida albicans* em permitir a penetração na mucosa, induzindo inchaço e esfoliação das células (Rodriguez-Cerdeira et al., 2012).

Esta pesquisa mostrou que pacientes do Grupo 1 tem 80% menos chance de positividade para cultura de *Candida spp.* que pacientes do Grupo 2, dados estes não encontrados na literatura. A positividade da cultura para *Candida spp.* em mucosa vaginal não apresentou associação estatisticamente significativa, o mesmo foi observado em estudo realizado por Rodriguez-Cerdeira et al. (2012). No entanto, Silva et al. (2014) observaram que a infecção vaginal por *Candida sp.* estava associada como fator de proteção na evolução para lesão de alto grau causada por HPV.

O estudo realizado por Nogueres et al. (2010) verificaram que o perfil de mulheres com processo inflamatório por *Candida spp.* está associado a histórico de DST, dentre elas, destaca-se a infecção pelo HPV. Voog et al. (1995) identificaram a possibilidade da infecção por *Candida* ativar o HPV latente já existente. Outros estudos mencionaram estas infecções como co-fatores no determinismo das neoplasias cervicais associadas ao HPV (Sobel et al., 1993; Platz-Christensen et al., 1994; Melo et al., 2003). Neste estudo a prevalência de casos de candidíase vulvovaginal em pacientes com HPV de alto risco para câncer do colo do útero foi de 27% no Grupo 1 e de 33% no

Grupo 2, um pouco acima do que pode ser encontrado em pacientes sem infecção por HPV (Bassayouni et al., 2016).

Das pacientes que apresentaram cultura positiva tanto em mucosa oral quanto em mucosa vaginal, se faz necessários novos estudos com realização da identificação molecular das espécies, para observar se estas espécies são da mesma cepa, assim como pesquisa de cepas do (a) parceiro (a) sexual também seria necessário para pesquisar uma transmissão por sexo oral/genital.

Além da grande dificuldade no entendimento do estabelecimento da candidíase vulvovaginal, outro problema de proporções preocupantes é o aparecimento de cepas resistentes aos antifúngicos existentes. Nas últimas três décadas, os processos de candidíase tem assumido um papel importante, principalmente em decorrência do uso de potentes drogas antibacterianas, corticoides, antifúngicos, agentes imunossupressores, aumento de transplantes de órgãos, desenvolvimento de neoplasias, além do aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (Odds, 1988). Estes fatores têm colaborado com a emergência de cepas resistentes a determinados antifúngicos, e consequentemente com o desenvolvimento de testes rápido de sensibilidade aos antifúngicos gerando grande impacto na prática (Arendrup et al., 2015).

Neste estudo analisamos o perfil de sensibilidade e os valores de CIM, através do método EUCAST, para as seguintes drogas antifúngicas: anfotericina B, fluconazol, voriconazol e caspofungina em todos os isolados dos Grupos 1 e 2 em relação as mucosas oral e vaginal. Os antifúngicos testados foram escolhidos a partir dos antifúngicos disponíveis nos protocolos existentes para traçar o perfil de sensibilidade.

Dessa forma observamos que, todos os isolados das mucosas oral e vaginal, dos Grupos 1 e 2 apresentaram sensibilidade para anfotericina B, com valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) entre 0,03 e 0,25 em mucosa oral e 0,25 e 0,5 para as amostras da mucosa vaginal no Grupo 1. E no Grupo 2 valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) entre 0,06 e 0,25 em mucosa oral e 0,25 e 0,5 para mucosa vaginal.

Em relação ao fluconazol, os valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) foram entre 0,12 e 2 para as cepas do Grupo 1 e 0,25 e 0,5 para os isolados do Grupo 2 em mucosa oral. Em mucosa vaginal os valores ficaram entre 0,25 e 0,5 em ambos os Grupos.

Uma cepa de *C. glabrata* foi isolada da mucosa vaginal no Grupo 1, no entanto esta cepa não se enquadrou no critério de classificação sensível - resistente preconizado pelo documento EucastEdef 7.3 (CIM  $8\mu\text{g/mL}$ ), devendo levar em consideração a clínica da paciente para indicação do tratamento, visto que dados da literatura indicam resistência de *C. glabrata* a fluconazol (Pfaller et al., 2003). E em uma paciente do grupo 2, foi isolada uma cepa de *C. tropicalis* na mucosa vaginal, que apresentou resistência para fluconazol (CIM =  $8\mu\text{g/mL}$ ).

O estudo realizado por Minea et al. (2015) também mostrou a susceptibilidade de *C. albicans* a fluconazol e voriconazol, e indicou uma alta resistência de *C. glabrata* aos azólicos. O perfil de sensibilidade expresso por estas espécies de *Candida* em relação aos azólicos coincide com os valores mundiais, que podem ser encontrados no trabalho de Pfaller et al. (2010).

Para voriconazol, os valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) ficaram entre 0,015 e 0,06 das cepas isoladas de mucosa oral dos Grupos 1 e 2, e entre 0,012 e 0,015 das cepas isoladas de mucosa vaginal de ambos os Grupos.

Os isolados também apresentaram sensibilidade a caspofungina com valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) entre 0,03 e 0,06 para as cepas do Grupo 1 e 0,03 para as do Grupo 2 de mucosa oral. Para os isolados da mucosa vaginal, os valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) ficaram entre 0,03 e 0,5 para os Grupos 1 e 2.

Em relação ao CIM<sub>50</sub>, *C. albicans* de ambas as mucosas e Grupos apresentaram uma alta sensibilidade a todos os antifúngicos, já em relação ao CIM<sub>90</sub>, *C. albicans* da mucosa vaginal de ambos os grupos, apresentaram resistência a caspofungina. Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> não puderam ser definidos para *C. glabrata* e *C. tropicalis* pelo baixo número de cepas isoladas. O mesmo pode ser observado no estudo de Romero et al. (2004), em que apesar de a caspofungina ser eficaz no tratamento das cepas isoladas, quando

avaliada a CIM<sub>90</sub> pode-se observar uma certa resistência para cepas de *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis* entre outras. Porém assim como observado neste estudo, caspofungina se mostra eficaz para o tratamento de infecções por *C. glabrata* e *C. tropicalis* espécies que apresentam maior resistência ao fluconazol.

Estes dados indicam que as cepas de *C. albicans* obtiveram um perfil de sensibilidade bastante parecido entre os dois grupos observados, não indicando cepas resistentes.

Assim, torna-se importante o acompanhamento e supervisão por meio de exames clínicos e laboratoriais das pacientes com HPV, reforçando a necessidade sobre cuidados, tratamento e prevenção de infecções relacionadas ao HPV e a *Candida spp.*





## 7 CONCLUSÕES

- As mulheres com lesões de alto grau causadas por HPV de alto risco para câncer do colo do útero possuem maior amplitude de faixa etária, escolaridade abaixo do nível superior e renda média maior que dois salários mínimos.
- Mulheres com lesões de alto grau causadas por HPV de alto risco para câncer do colo do útero possuem maior prevalência para diabetes, e as pacientes com lesões de baixo grau possuem maior prevalência para lúpus, HIV e linfopenia;
- A manifestação clínica de candidíase vulvovaginal foi baixa em relação às culturas positivas;
- A prevalência de *Candida spp.* em mucosa oral e vaginal foi maior para espécies *albicans*, seguida em ordem decrescente por *C. tropicalis* e *C. glabrata*.
- *C. albicans* apresentou sensibilidade a todos os antifúngicos testados;
- *C. tropicalis* apresentou o maior perfil de resistência, sendo resistente ao fluconazol;
- *C. glabrata* apresentou o valor de MIC em uma zona de transição para fluconazol, sugerindo atenção, sendo sensível para os outros antifúngicos testados;
- Anfotericina B, voriconazol e caspofungina apresentaram sensibilidade para todas as cepas isoladas;
- Fluconazol mostrou resistência para cepas não-*albicans*.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Acikgoz ZC, Sancak B, Gamberzade S, Misirlioglu M. Prevalence of *Candida dubliniensis* among the stored vaginal *Candida* isolates in a Turkish hospital. *Mycoses*. 2004 Oct;47(9-10):393-6.

Alnuaimi AD, Wiesenfeld D, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, McCullough MJ. Oral *Candida* colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study. *Oral Oncol*. 2015 Feb;51(2):139-45. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.11.008.

Arendrup M, Lundgren B, Jensen IM, Hansen BS, Frimodt-Møller N. Comparison of Etest and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2001 May;47(5):521-6.

Arendrup MC, Guinea J, Cuenca-Estrella M, Meletiadis J, Moutin JW, Lagrou K, Howard SJ, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. 2015. Def 7.3.

Bakri MM, Rich AM, Cannon RD, Holmes AR. In vitro expression of *Candida albicans* alcohol dehydrogenase genes involved in acetaldehyde metabolism. *Mol Oral Microbiol*. 2015 Feb;30(1):27-38. doi: 10.1111/omi.12064.

Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíase. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. 2010; 22(1):22-38.

Barbosa C, Fernandes G, Quintas C, Teixeira ME, Neves JP. Anti-fungal treatment with azole compounds for uncomplicated vulvovaginal candidiasis. Derivados azólicos no tratamento da Candidíase vulvovaginal não Complicada. *Acta Obstet Ginecol Port*. 2012; 6(3), 118-23.

Bassyouni RH, Wegdan AA, Abdelmoneim A, Said W, AboElnaga F. Phospholipase and Aspartyl Proteinase Activities of *Candida* Species Causing Vulvovaginal Candidiasis in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Microbiol Biotechnol*. 2015 Oct;25(10):1734-41.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

Bermedo-Carrasco S, Waldner CL. The role of socio-demographic factors in premature cervical cancer mortality in Colombia. *BMC Public Health*. 2016 Sep; 15:16:981. doi: 10.1186/s12889-016-3645-1.

Brandolt TM, Klafke GB, Gonçalves CV, Bitencourt LR, Martinez AM, Mendes JF, Meireles MC, Xavier MO. Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. *Braz J Microbiol*. 2016 Oct 4. pii: S1517-8382(16)30903-0. doi: 10.1016/j.bjm.2016.09.006.

Brito YS, León CML, Cardellá VK, Maiza AG, de Paz VC, Jiménez MM. Papilomavirus humanos y otros factores asociados al desarrollo de lesiones cervicouterinas en mujeres cubanas. *Panorama Cuba y Salud*, 2016;11(1):24-33.

Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG*. 2015 May;122(6):785-94. doi: 10.1111/1471-0528.12994.

Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG*. 2015 May;122(6):785-94. doi: 10.1111/1471-0528.12994.

Cassone A, De Bernardis F, Santoni G. Anticandidal immunity and vaginitis: novel opportunities for immune intervention. *Infect Immun*. 2007 Oct;75(10):4675-86.

Castro-Silva II, Coutinho LA, Júnior JAS, Pires AR, Bastos OM. Percepcao de Vulnerabilidade ao HPV e Cancer de Cabeça e Pescoco: Comportamentos Sexuais e de Risco em Jovens de Niterói, RJ. *DST. J Bras Doencas Sexualmente Transmissíveis*. 2012;24: 85-92.

Cawson RA. Leukoplakia and oral cancer. *Proc R Soc Med*. 1969 Jun;62(6):610-5

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard M27-A2. [Internet] Wayne PA: CLSI; 2002.

Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. 2007 Mar; 30;315(5820):1850-3.

Cordel N, Ragin C, Trival M, Tressières B, Janky E. High-risk human papillomavirus cervical infections among healthy women in Guadeloupe. *Int J Infect Dis.* 2015 Dec;41:13-6.

Coser J, Boeira Tda R, Wolf JM, Cerbaro K, Simon D, Lunge VR. Cervical human papillomavirus infection and persistence: a clinic-based study in the countryside from South Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2016 Jan-Feb;20(1):61-8.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, Rodriguez-Tudela JL. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2010 May;48(5):1782-6. doi: 10.1128/JCM.02316-09.

Dahiya MC, Redding SW, Dahiya RS, Eng TY, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Sadkowski LC, Fothergill AW, Waite A, Rinaldi MG, Patterson TF, Thomas CR. Oropharyngeal candidiasis caused by non-albicans yeast in patients receiving external beam radiotherapy for head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Sep;1;57(1):79-83.

Dai Q, Hu L, Jiang Y, Shi H, Liu J, Zhou W, Shen C, Yang H. An epidemiological survey of bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis and trichomoniasis in the Tibetan area of Sichuan Province, China. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010 Jun;150(2):207-9.

Durán MT, Velasco D, Canle D, Moure R, Villanueva R. [Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from blood cultures in a five-year period (1997-2001)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003 Nov;21(9):488-92.

Engberts MK, Vermeulen CF, Verbruggen BS, van Haaften M, Boon ME, Heintz AP. *Candida* and squamous (pre)neoplasia of immigrants and Dutch women as established in population-based cervical screening. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Jul-Aug;16(4):1596-600.

Espinel-Ingroff A. Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing zygomycetes, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and amphotericin B. *J Clin Microbiol.* 2006 Oct;44(10):3616-22.

Fernandes JV, De Medeiros Fernandes TA, De Azevedo JC, et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (review). *Oncol Lett* 2015;9:1015-26.

Ferris DG, Nyirjesy P, Sobel JD, Soper D, Pavletic A, Litaker MS. Over-the-counter antifungal drug misuse associated with patient-diagnosed vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol*. 2002 Mar;99(3):419-25.

Gall F, Colella G, Di Onofrio V, Rossiello R, Angelillo IF, Liguori G. *Candida* spp. in oral cancer and oral precancerous lesions. *New Microbiol*. 2013 Jul;36(3):283-8.

Gunther LS, Martins HP, Gimenes F, Abreu AL, Consolaro ME, Svidzinski TI. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. *Med J*. 2014;132(2):116-20.

Henrique PR, Bazaga MJ, Araújo VC, Junqueira JLC, Furuse C. Prevalência de alterações da mucosa bucal em indivíduos adultos da população de Uberaba, Minas Gerais. *RGO*. 2009;57(3):261-7.

Hettmann A, Demcsák A, Decsi G, Bach Á, Pálinkó D, Rovó L, Nagy K, Takács M, Minarovits J. Infectious Agents Associated with Head and Neck Carcinomas. *Adv Exp Med Biol*. 2016;897:63-80.

Hsia CC, Sun TT, Wang YY, Anderson LM, Armstrong D, Good RA. Enhancement of formation of the esophageal carcinogen benzylnitrosamine from its precursors by *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Mar;78(3):1878-81.

Hooper SJ, Wilson MJ, Crean SJ. Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head Neck*. 2009 Sep;31(9):1228-39. doi: 10.1002/hed.21140.

Hu T, Li YS, Chen B, Chang YF, Liu GC, Hong Y, Chen HL, Xiyang YB. Elevated glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in the cervical cancer cases is associated with the cancerigenic event of high-risk human papillomaviruses. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015 Oct;240(10):1287-97.

Hu T, Chang YF, Xiao Z, Mao R, Tong J, Chen B, Liu GC, Hong Y, Chen HL, Kong SY, Huang YM, Xiyang YB, Jin H. miR-1 inhibits progression of high-risk

papillomavirus-associated human cervical cancer by targeting G6PD. *Oncotarget*. 2016 Nov; 15. doi: 10.18632/oncotarget.13344.

INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2016. [Citado em: 10 de Nov de 2016]. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo\\_uterio/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao).

INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Falando sobre Câncer do Colo do Útero. Rio de Janeiro. Ministério da Saúde; 2002.

Kataja V, Syrjänen S, Yliskoski M, Hippeläinen M, Väyrynen M, Saarikoski S, Mäntyjärvi R, Jokela V, Salonen JT, Syrjänen K. Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case-control study. *Am J Epidemiol*. 1993 Nov; 138(9):735-45.

Koskela P, Anttila T, Bjørge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, Hakulinen T, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Luostarinen T, Pukkala E, Saikku P, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer*. 2000 Jan 1;85(1):35-9.

Krogh P. The role of yeasts in oral cancer by means of endogenous nitrosation. *Acta Odontol Scand*. 1990 Feb;48(1):85-8.

Krogh P, Hald B, Holmstrup P. Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting *Candida albicans* and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine. *Carcinogenesis*. 1987 Oct;8(10):1543-8.

Kurago ZB, Lam-ubol A, Stetsenko A, De La Mater C, Chen Y, Dawson DV. Lipopolysaccharide-squamous cell carcinoma-monocyte interactions induce cancer-supporting factors leading to rapid STAT3 activation. *Head Neck Pathol*. 2008 Mar;2(1):1-12. doi: 10.1007/s12105-007-0038-x.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2011.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Mello NT. Tratado de micologia médica Lacaz. São Paulo: Savier; 2002.

Linares CEB, Dagios G, Carat MR, Gasparin MP, Neto AT, Scheid LA, Schubert A. Estudo epidemiológico e perfil da suscetibilidade de amostras de candida isoladas de mulheres com candidíase vulvovaginal em frederico westphalen-rs. Saúde. 2005; 31(1 e 2): 42-46

Leto MDGP, Júnior GFS, PorroAM, Tomimori J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. An Bras Dermatol. 2011; 86(2): 11.

Lott TJ, Fundyga RE, Brandt ME, Harrison LH, Sofair AN, Hajjeh RA, Warnock DW. Stability of allelic frequencies and distributions of *Candida albicans* microsatellite loci from US population-based surveillance isolates. J clin microbiology. 2003; 41(3): 1316-1321.

Lowy DR, Schiller JT. Reducing HPV-associated cancer globally. Cancer Prev Res(Phila). 2012 Jan;5(1):18-23. doi: 10.1158/1940-6207.

Lucas ICRN, Freitas AF, de Oliveira SM, da Silva JA, Gomes DAGDS. Prurido vulvar: diagnóstico diferencial para médicos generalistas. Ver Med e Saúde de Brasília. 2012. 1(1).

Manhart LE, Koutsky LA. Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. Sex Transm Dis. 2002 Nov;29(11):725-35.

Medeiros MAPD. Aspectos de patogenicidade e relacionamento genético de isolados clínicos vaginas e anais de *Candida albicans* oriundos de pacientes com candidíase vulvovaginal. [Dissertação] [Internet]. Natal, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2013. [citada em 25 nov 2016]. Disponível em <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/13481>

Melo VH, Araújo ACL, do Rio SMP, de Castro LPF, de Azevedo AA, de Castro MM. Problemas ginecológicos mais freqüentes em mulheres soropositivas para o HIV. RBGO. 2003; 25(9).

Meshher D, Panwar K, Thomas SL, Beddows S, Soldan K. Continuing reductions in HPV 16/18 in a population with high coverage of bivalent HPV vaccination in England: an ongoing cross-sectional study. BMJ Open. 2016 Feb 11;6(2):e009915.

Meurman JH. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. Oral oncology. 2010. 46(6), 411-3



Meurman JH, Uittamo J. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. *Acta Odontol Scand*. 2008;66(6):321-6. doi: 10.1080/00016350802446527.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Jun;91(6):622-35.

Minea B, Nastasa V, Moraru RF, Kolecka A, Flonta MM, Marincu I, Man A, Toma F, Lupse M, Doroftei B, Marangoci N, Pinteala M, Boekhout T, Mares M. Species distribution and susceptibility profile to fluconazole, voriconazole and MXP-4509 of 551 clinical yeast isolates from a Romanian multi-centre study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Feb;34(2):367-83. doi: 10.1007/s10096-014-2240-6.

Mintz JD, Martens MG. Prevalence of non-albicans *Candida* infections in women with recurrent vulvovaginal symptomatology. *Adv in Infec Dis*. 2013; 3(04), 238.

Mohd Bakri M, Mohd Hussaini H, Rachel Holmes A, David Cannon R, Mary Rich A. Revisiting the association between candidal infection and carcinoma, particularly oral squamous cell carcinoma. *J Oral Microbiol*. 2010 Dec 21;2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5780.

Molano M, Moreno-Acosta P, Morales N, Burgos M, Buitrago L, Gamboa O, Alvarez R, Garland SM, Tabrizi SN, Steenbergen RD, Mejía JC. Association Between Type-specific HPV Infections and hTERT DNA Methylation in Patients with Invasive Cervical Cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 2016; 11-12;13(6):483-91.

Moss SF, Blaser MJ. Mechanisms of disease: inflammation and the origin of cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2(2):90-97.

Nieminen MT, Novak-Frazer L, Rautemaa V, Rajendran R, Sorsa T, Ramage G, Bowyer P, Rautemaa R. A novel antifungal is active against *Candida albicans* biofilms and inhibits mutagenic acetaldehyde production in vitro. *PLoS One*. 2014 May 27;9(5):e97864.

Nieminen MT, Uittamo J, Salaspuro M, Rautemaa R. Acetaldehyde production from ethanol and glucose by non-*Candida albicans* yeasts in vitro. *Oral Oncol*. 2009 Dec;45(12):e245-8.

Nogueres I B, Zimmermann JB, Gonçalves LG, Fontes L.C, Alves LF, Gontijo CC. Associação entre a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e outras infecções genitais femininas. *HU Rev*, 2010;36(1).

Odds FC. *Chronic mucocutaneous candidosis*. University Park Press: Baltimore MD. 1988; pp.104-110.

Ortiz ME, Croxatto HB. Copper-T intrauterine device and levonorgestrel intrauterine system: biological bases of their mechanism of action. *Contraception* 2007;75:S16-30.

Park NH, Li SL, Xie JF, Cherrick HM. In vitro and animal studies of the role of viruses in oral carcinogenesis. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992;28B:145–52.

Peixoto JV, Rocha MG, Nascimento RTL, Moreira VV, Kashiwabara TGB. Candidíase—Uma Revisão de Literatura. *Braz J Surg Clin Res*. 2014;8:75-82.

Pereira DC, Backes LTH, Calil LN, Fuentefria AM. A six-year epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in cytopathology reports in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Patol Trop*, 2012;41(2): 163-8.

Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Mar;47(3):1068-71.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA; Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr;48(4):1366-77. doi: 10.1128/JCM.02117-09.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, Rodriguez-Noriega E. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997-2005: An 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):1735-45.

Pinto AP, Tulio S, Cruz OR. Hpv cofactors in cervical carcinogenesis. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2002 Jan-Mar;48(1):73-8.

Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB, Tavares AS, Luz PS, Santos TC. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci.* 2013 Sep-Oct;21(5):460-7. doi: 10.1590/1679-775720130317.

Platz-Christensen J J, Sundström E, Larsson P G. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica.* 1994;73(7):586-88.

Ramirez-Garcia A, Rementeria A, Aguirre-Urizar JM, Moragues MD, Antoran A, Pellon A, Abad-Diaz-de-Cerio A, Hernando FL. *Candida albicans* and cancer: Can this yeast induce cancer development or progression? *Crit Rev Microbiol.* 2014;42(2):181-93.

Rashid S, Labani S, Das BC. Knowledge, Awareness and Attitude on HPV, HPV Vaccine and Cervical Cancer among the College Students in India. *PLoS One.* 2016 Nov 18;11(11):e0166713.

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):643-58

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 Obstet Gynecol.* 2012;2012:240190. Doi:105402/2012/240190

Rodrigues MT, Gonçalves AC, Alvim MC, Castellano Filho DS, Zimmermann JB, da Silva VL, Diniz CG. Association between vaginal secretion culture, socio-demographic characteristics and clinical manifestations of patients with vulvovaginal candidiasis. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2013 Dec;35(12):554-61.

Rodrigues MT, Gonçalves AC, Alvim MC, Castellano Filho DS, Zimmermann JB, da Silva VL, Diniz CG. Association between vaginal secretion culture, socio-demographic characteristics and clinical manifestations of patients with vulvovaginal candidiasis. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2013 Dec;35(12):554-61.

Rodriguez-Tudela JL, Gomez-Lopez A, Arendrup MC, Garcia-Effron G, Perlin DS, Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M. Comparison of caspofungin MICs by means of EUCAST method EDef 7.1 using two different concentrations of glucose. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jul;54(7):3056-7. doi: 10.1128/AAC.00597-10.

Roeters AM, Boon ME, van Haaften M, Vernooij F, Bontekoe TR, Heintz AP. Inflammatory events as detected in cervical smears and squamous intraepithelial lesions. *Diagn Cytopathol.* 2010 Feb;38(2):85-93.

Roset Bahmanyar E, Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsagué X, Teixeira JC, Skinner SR, Jaisamrarn U, Limson GA, Garland SM, Szarewski A, Romanowski B, Aoki F, Schwarz TF, Poppe WA, De Carvalho NS, Harper DM, Bosch FX, Raillard A, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G; HPV PATRICIA Study Group. Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in young adult women at enrolment in the multinational PATRICIA trial. *Gynecol Oncol.* 2012 Dec;127(3):440-50.

Romero M, Cantón E, Pemán J, Gobernado M. Study of in vitro activity of caspofungin on non-*Candida albicans* yeast strains determined by two methods: M27-A2 and EUCAST. *Rev Esp Quimioter.* 2004 Sep;17(3):257-62.

Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002 Nov;20(9):462-9; quiz 470, 479.

Scalercio M, Valente T, Israel MS, Ramos ME. Estomatite protética versus candidíase: diagnóstico e tratamento. *RGO.* 2007;55(4):395-8.

Schmidt BL, Dierks EJ, Homer L, Potter B. Tobacco smoking history and presentation of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Sep;62(9):1055-8.

Sahingur SE, Yeudall WA. Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. *Front Immunol.* 2015 May 5;6:214. doi: 10.3389/fimmu.2015.00214.

Sanjaya PR, Gokul S, Gururaj Patil B, Raju R. *Candida* in oral pre-cancer and oral cancer. *Med Hypotheses.* 2011 Dec;77(6):1125-8.

Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013 Jan;62(Pt 1):10-24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0.

Silva C, Almeida EC, Cobo Ede C, Zeferino VF, Murta EF, Etchebehere RM. A retrospective study on cervical intraepithelial lesions of low-grade and undetermined significance: evolution, associated factors and cytohistological correlation. *Sao Paulo Med J.* 2014;132(2):92-6.

Sitheeque MA, Samaranayake LP. Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(4):253-67.

Shaw E, Ramanakumar AV, El-Zein M, Silva FR, Galan L, Baggio ML, Villa LL, Franco EL; Ludwig-McGill Cohort Study.. Reproductive and genital health and risk of cervical human papillomavirus infection: results from the Ludwig-McGill cohort study. *BMC Infect Dis.* 2016 Mar 8;16:116.

SOBEL JD. Candidal vulvovaginitis. *Clin Obst and Gyn, Hagerstown.* 1993;153-165.

Souza SEBD. Conhecimento e atitude de enfermeiros sobre câncer do colo do útero, infecção pelo Papilomavirus humano vacinas contra Papilomavirus humano e vacinas contra Papilomavirus humano. [Tese] [Internet]. Salvador, Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. 2015. [Citado em 20 nov 2016] Disponível em <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/12238>

St-Germain G. Impact of endpoint definition on the outcome of antifungal susceptibility tests with *Candida* species: 24- versus 48-h incubation and 50 versus 80% reduction in growth. *Mycoses.* 2001;44(1-2):37-45.

Sung YE, Ki EY, Lee YS, Hur SY, Lee A, Park JS. Can human papillomavirus (HPV) genotyping classify non-16/18 high-risk HPV infection by risk stratification? *J Gynecol Oncol.* 2016 Nov;27(6):e56.

Takakura S, Fujihara N, Saito T, Kudo T, Inuma Y, Ichiyama S. National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Feb;53(2):283-9.

Uittamo J, Siikala E, Kaihovaara P, Salaspuro M, Rautemaa R. Chronic candidosis and oral cancer in APECED-patients: Production of carcinogenic acetaldehyde from glucose and ethanol by *Candida albicans*. *Intern J of Cancer.* 2009;124(3): 754-756.

Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010 Jun;46(6):423-5.

Voog E, Bolmsted, A, Olofsson S, Ryd W, Löwhagen GB. Human papilloma virus infection among women attending an STD clinic correlated to reason for attending, presence of clinical signs, concomitant infections and abnormal cytology. *Acta dermato-venereologica*, 1995; 75(1): 75-78.

Xiao M, Xu Q, Li H, Gao H, Bie Y, Zhang Z. Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes Among Women With High-Grade Cervical Lesions in Beijing, China. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Jan;95(3):e2555.

Williamson DM. Chronic hyperplastic candidiasis and squamous carcinoma. *Br J Dermatol*. 1969 Feb;81(2):125-7.

Zardo GP, Farah FP, Mendes FG, Franco CAGS, Molina GVM, Melo GND, Kusma SZ. Vacina como agente de imunização contra o HPV. *Ciênc e Saúde Coletiva*. 2014; 19(9): 3799-3808

## ANEXO A- Questionário

|   |         |   |  |
|---|---------|---|--|
| Nome  |         | Data: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>      |  |
| Nº HC:  |         | Data Nasc: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> |  |
| Peso:   | Altura: | IMC:  |  |
| Estado Civil <input type="checkbox"/> Solteira <input type="checkbox"/> Casada <input type="checkbox"/> Amasiada <input type="checkbox"/> Viúva   |         | Renda mensal: <input type="text"/> Sal. mín                                   |  |
| Escolaridade <input type="checkbox"/> Fundamenta <input type="checkbox"/> Médio <input type="checkbox"/> Superior   |         | <input type="checkbox"/> Comp. <input type="checkbox"/> Incomp.               |  |
| <b>Antecedentes</b>   |         |   |  |
| Menarca <input type="text"/> anos   |         | Ciclos <input type="checkbox"/> Reg <input type="checkbox"/> Irreg            |  |
|   |         | Menopausa <input type="text"/> anos <input type="checkbox"/> Não se aplica    |  |
| DUM <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>  |         | Coitaca <input type="text"/> anos   |  |
|   |         | Nº parceiros último ano   |  |
| MAC <input type="checkbox"/> ACO <input type="checkbox"/> DIU <input type="checkbox"/> IM <input type="checkbox"/> IT <input type="checkbox"/> CAM <input type="checkbox"/> Reg <input type="checkbox"/> Irreg <input type="checkbox"/> Outros <input type="text"/> |         |   |  |
| Dispareunia <input type="checkbox"/> Penetração <input type="checkbox"/> Após <input type="checkbox"/> Não  |         | Tabagismo <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não           |  |
|   |         | Alcool <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não              |  |
| Uso de Drogas <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não   |         | Roupe íntima <input type="checkbox"/> algodão <input type="checkbox"/> lycra  |  |
|   |         | Sab. Hig. íntima <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não    |  |
| DST <input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> Herpes <input type="checkbox"/> HPV <input type="checkbox"/> Sífilis <input type="checkbox"/> Gonorreia <input type="checkbox"/> Outros <input type="text"/> <input type="checkbox"/> Não                 |         |   |  |
| Doenças Crônicas:   |         |   |  |
| Medicamentos em uso:  |         |   |  |
| Última vez que usou anticoncepc:  |         |   |  |
| Observações:  |         |   |  |

## Anamnese

|    | Queixa             | Tempo | Recidiva |    | Queixa                | Tempo | Recidiva |
|----|--------------------|-------|----------|----|-----------------------|-------|----------|
| 1A | Corrimento grumoso |       |          | 1B | Inchaço               |       |          |
| 1C | Coceira            |       |          | 1D | Dor urinária terminal |       |          |
| 1E | Ardência           |       |          | 1F | Dispareunia           |       |          |
| 1G | Dor em BV          |       |          |    |                       |       |          |
| 1H | Outros             |       |          |    |                       |       |          |

Obs: O tempo deve ser anotado em dias.

|              |
|--------------|
| Observações: |
|--------------|

## Exame Físico

|    | Sinal           |    | Sinal                        |
|----|-----------------|----|------------------------------|
| 2A | Dor palpação BV | 2B | Corrimento granuloso branco  |
| 2C | Fissuras        | 2D | Lábios vulvares eritematosos |
| 2E | Outros          |    |                              |



FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo da relação entre as espécies de Candida, das mucosas oral e vaginal, com as lesões de alto grau do colo uterino causadas por HPV de alto risco.

**Pesquisador:** Ana Clara de Souza

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 52071215.8.0000.0075

**Instituição Proponente:** Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.484.284

**Apresentação do Projeto:**

A candidíase vulvovaginal (CVV) é a segunda maior causa de infecção vaginal, afetando até 75% das mulheres em idade fértil, sendo que 5% terão infecções recorrentes.

A candidíase oral juntamente com a CVV são as formas mais comuns de doenças fúngicas oportunistas. Estudos tem confirmado a capacidade de espécies de Candida em promover a carcinogênese através da produção de acetaldeído a partir do etanol. Como o câncer de colo de útero é iniciado por infecções crônicas pelo HPV, as espécies do gênero Candida podem também participar na carcinogênese. Para se pesquisar a frequência das diferentes espécies de Candida em mulheres portadoras de lesões de alto e baixo grau da cérvix uterina, portadoras do HPV de alto risco para o câncer ginecológico e suas correlações com as cepas presentes na cavidade oral, sugere-se a realização deste estudo.

Serão incluídas as mulheres que assinarem o TCLE aceitando participar da pesquisa, num total de 60 mulheres. Para as que tiverem indicação de realizar colposcopia, será coletado material vaginal e oral durante a consulta ginecológica, que será realizada para aquelas mulheres acompanhadas no ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior (PTGI), do Serviço de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. Este grupo será dividido em dois, sendo 30 mulheres com lesões de alto grau (neoplasia intra-epitelial cervical graus 2 e 3) e portadoras dos sorotipos de HPV de alto risco

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 05.508-900

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3091-7960

**Fax:** (11)3091-7814

**E-mail:** cepfo@usp.br





FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.484.284

para o câncer do colo uterino e outras 30 mulheres portadoras de lesão de baixo grau e também positivas para HPV de alto risco para o câncer do colo uterino. As mulheres podem ser ou não sintomáticas para vulvovaginites.

As coletas serão feitas através de "swabs" vaginais e orais que serão utilizados para sementeira imediata em meio de cultura e para a realização de esfregaço. Será também coletado material para esfregaço e confecção de lâmina para citologia oncológica.

Serão excluídas mulheres grávidas, diabéticas, portadoras de HIV ou outras doenças imunossupressoras, mulheres que estejam no período menstrual ou que não tenham indicação para colposcopia, mulheres não portadoras dos sorotipos de HPV de alto risco para o câncer de colo uterino, e as que não aceitarem participar da pesquisa ou assinar o TCLE.

**Objetivo da Pesquisa:**

São objetivos deste estudo:- Comparar a prevalência das espécies de Candida em mulheres portadoras de lesão de alto e baixo grau da cérvix uterina, portadoras dos sorotipos de HPV de alto risco, a fim de avaliar se a participação de determinadas espécies de Candida predisporiam a mulher a evoluir para as lesões de alto grau.

Secundariamente: 1- Relacionar as lesões cervicais de alto grau com a ocorrência de candidíase de repetição (4 ou mais episódio por ano)

2- Tipificar as diferentes espécies de Candida encontradas nas mucosas oral e vaginal, comparando o perfil fenotípico da mucosa oral com a mucosa vaginal

3- Determinar o perfil de sensibilidade às drogas antifúngicas – Fluconazol, Anfotericina-B, Anidulafungina, Voriconazol, Caspofungina e Nistatina

4- Determinar os fatores relacionados a virulência– Proteinase e Fosfolipase

5- Realizar o exame de Papanicolau nas pacientes.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são mínimos, visto que são pacientes que já serão submetidas ao exame de colposcopia rotineiramente. A possível descoberta de infecções fúngicas ou bacterianas, será informada à paciente, pela ginecologista do ambulatório de PTGI, que faz o acompanhamento e que fará a indicação do adequado tratamento.

A depender dos resultados estes exames serão mais um passo para identificar ou excluir possíveis causas do câncer de colo de útero, sendo que os exames não gerarão nenhum gasto adicional para paciente e todos os resultados estarão disponíveis para a participante.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

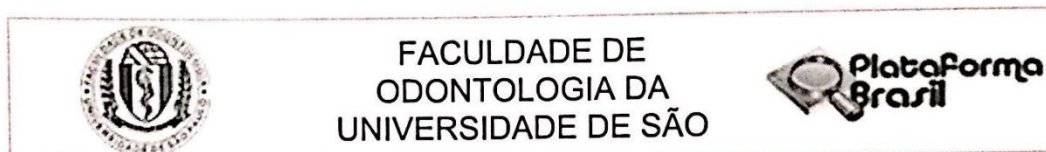
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 1.484.284

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Relevante pois a depender dos resultados será mais um passo na prevenção do câncer de colo de útero.

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

Todos os termos foram apresentados a saber: Projeto completo; Informações básicas do projeto; Folha de rosto; Declarações das instituições co-participantes; TCLE e as pendências foram adequadamente respondidas, não havendo impedimento ético.

**Recomendações:**

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site [www.saude.gov.br/plataformabrasil](http://www.saude.gov.br/plataformabrasil)).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

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

Não há pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento  | Arquivo                                      | Postagem               | Autor              | Situação |
|---|--|------------------------|--------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_596588.pdf | 14/03/2016<br>12:27:38 |                    | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | ProjetoDetalhadoCorrigido.doc                | 14/03/2016<br>12:26:58 | Ana Clara de Souza | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | tcLenovoCorrigido.docx                       | 14/03/2016<br>12:26:20 | Ana Clara de Souza | Aceito   |
| Cronograma  | CRONOGRAMACorrigido.docx                     | 13/03/2016<br>21:03:57 | Ana Clara de Souza | Aceito   |
| Outros  | RESPOSTAAOPARECERCONSUBSTANCIADODOCEP.pdf    | 29/02/2016<br>19:23:23 | Ana Clara de Souza | Aceito   |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | ana.pdf                                      | 09/12/2015<br>20:22:41 | Ana Clara de Souza | Aceito   |

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: [cepfo@usp.br](mailto:cepfo@usp.br)



FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.484.284

|  |                        |                        |                    |        |
|--|------------------------|------------------------|--------------------|--------|
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | declaracaolabcell.pdf  | 30/11/2015<br>14:39:11 | Ana Clara de Souza | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | declaracaounioeste.pdf | 30/11/2015<br>14:38:28 | Ana Clara de Souza | Aceito |
| Orçamento                                  | Orcamento.docx         | 18/11/2015<br>15:25:25 | Ana Clara de Souza | Aceito |
| Folha de Rosto                             | folhaderosto.pdf       | 18/11/2015<br>15:21:39 | Ana Clara de Souza | Aceito |
| Outros                                     | questionario.docx      | 10/11/2015<br>16:38:55 | Ana Clara de Souza | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 08 de Abril de 2016

Assinado por:

Maria Gabriela Haye Biazevic  
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br



ANEXO C – Parecer consubstanciado CEP HC-FMUSP

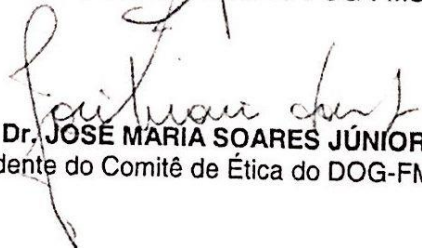
**APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na 231ª reunião no dia 10 de Maio de 2016, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de pesquisa “**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES DE CÂNDIDA, DAS MUCOSAS ORAL E VAGINAL, COM LESÕES DE ALTO GRAU DO COLO UTERINO CAUSADAS POR HPV DE ALTO RISCO**” dos seguintes pesquisadores: Ana Clara de Souza, Claudete Rodrigues Paula, Marcos Ereno Auler, Murício Turkiewicz, Jacqueline Plewka, Paulo Francisco Ramos Margarido, Noely Paula Cristina Lorenzi, Edmund Chada Baracat.

São Paulo, 10 de Maio de 2016.




**Prof. Dr. SEIZO MIYADAHIRA**  
Presidente do Comitê de Ética do DOG-FMUSP



**Prof. Dr. JOSÉ MARIA SOARES JÚNIOR**  
Vice-Presidente do Comitê de Ética do DOG-FMUSP

**APROVADO PELO CONSELHO  
DO DOG EM 10/05/2016**



**Profa. Dra. ROSSANA P.V. FRANCISCO**  
Chefe do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

## ANEXO D – TCLE



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA



(1ª via – Pesquisador)  
(2ª via – Voluntário)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos a Senhora para participar da pesquisa “**Estudo da relação entre as espécies de *Candida* isoladas das mucosas oral e vaginal com as lesões de alto grau do colo uterino causadas por HPV de alto risco**”, que está sob responsabilidade da pesquisadora Ana Clara de Souza. Sua participação é totalmente voluntária.

O **objetivo geral** desta pesquisa é avaliar a relação das infecções fúngicas com o aparecimento de câncer do colo do útero. Para isso a médica ginecologista do ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior FMUSP realizará a coleta de secreção vaginal e a farmacêutica Ana Clara de Souza, responsável por esta pesquisa, realizará a coleta de secreção oral. A participante da pesquisa também responderá a um questionário sobre sintomas, antecedentes sexuais, hábitos, vícios, comorbidades, tratamentos anteriores e medicamentos em uso. Tudo o que for preciso para esses exames será coletado durante a consulta para realização do exame de colposcopia que a participante da pesquisa está indicada a fazer na data de hoje.

**Procedimento:** Após concordar em participar do estudo, a participante da pesquisa responderá o questionário e será encaminhada para a coleta das amostras necessárias. A coleta de secreção oral será realizada com o auxílio de um palito estéril de plástico, com um tipo de algodão na ponta, o qual coletará amostra da parte interna da bochecha da voluntária. Para a coleta de secreção vaginal a médica ginecologista irá passar outro palito estéril dentro da vagina da participante da pesquisa e irá coletar um pouco do muco que está ali. Neste momento será também realizada a coleta para exame de Papanicolaou. Após a coleta dessas amostras a médica ginecologista irá realizar o exame de colposcopia. As amostras coletadas serão enviadas para os laboratórios onde serão realizados os exames necessários. As amostras não serão guardadas, apenas utilizadas para fazer os exames e descartadas de acordo com os procedimentos operacionais de cada laboratório responsável.

Visto que a abordagem à participante da pesquisa e a realização das coletas será realizada no momento em que a mesma estará no ambulatório de PTGI/FMUSP para a o acompanhamento ginecológico e que não será necessário retorno desta paciente para dar continuidade ao estudo, **não haverá gastos ou pagamentos** para participar desta pesquisa. Ressaltamos que a participante da pesquisa terá direito a **indenização** em caso de danos recorrentes de sua participação no estudo.

---

Rubrica do Participante da Pesquisa

---

Rubrica do Pesquisador Responsável



O **risco** da sua participação é mínimo, inerente aos procedimentos, visto que serão realizados exames de rotina, onde o desconforto dos exames complementares (coleta de secreção e Papanicolaou) ocorrerá independente de sua participação na pesquisa. **A realização deste exame não é contra-indicado em caso de gravidez, no entanto, para participar deste estudo não entrarão participantes gestantes. Caso a confirmação de gravidez venha em momento posterior a esta consulta, por favor, nos avise (30917893).** Como **benefícios** previstos na sua participação nesta pesquisa estarão a obtenção de exames ginecológicos gratuitos, além de que esta pesquisa poderá trazer avanços científicos nos casos de doenças relacionadas à saúde da mulher.

Caso a participante da pesquisa sinta a sua integridade (moral, psicológica e social) comprometida deverá relatar o ocorrido ao Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição pelo telefone 3091-7960, ou pelo e-mail [cepfo@usp.br](mailto:cepfo@usp.br) ou no endereço AV. Prof. Lineu Prestes, 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP. Horário de funcionamento: segunda a sexta-feira das 8 às 17h (exceto feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberado e educativo, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº466 de 2012)

Os resultados obtidos ficarão sob cuidado dos pesquisadores envolvidos no projeto, e serão utilizados como dados de pesquisa científica, podendo vir a serem divulgados em artigos e/ou congressos, resguardando sempre o **sigilo** quanto a sua identificação. As informações fornecidas serão **confidenciais** e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis.

Se acaso este estudo for descontinuado as suas informações e resultados dos exames não serão utilizados.

Caso a participante da pesquisa deseje **retirar seu consentimento**, em qualquer fase da pesquisa, poderá fazê-lo sem qualquer prejuízo ou punição.

O estudo será conduzido pela aluna de Mestrado e Pesquisadora Ana Clara de Souza, que estará à disposição para esclarecimentos e prestar a devida assistência no decorrer da pesquisa no endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, São Paulo – SP ou pelo telefone 3091-7893, de segunda a sexta-feira das 8 às 17h (exceto feriados e recesso universitário), ou pelo e-mail [anaah@usp.br](mailto:anaah@usp.br) a qualquer momento.

---

Rubrica do Participante da Pesquisa

---

Rubrica do Pesquisador Responsável

### Consentimento pós-informação

Eu, \_\_\_\_\_, fui informada sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou receber valor algum em dinheiro para participar e que posso desistir quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

#### Dados do Paciente:

NOME DA PACIENTE: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO \_\_\_\_\_

Nº \_\_\_\_\_ APTO: \_\_\_\_\_ BAIRRO: \_\_\_\_\_

CIDADE: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

TELEFONE: DDD (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

#### Acerca dos resultados dos exames:

Declaro que quero ser contatada e informada sobre os resultados dos exames que serão realizados

Declaro que não quero ser contatada e informada sobre os resultados dos exames que serão realizados

#### Acerca de novas pesquisas:

Declaro que as informações obtidas no questionário e resultados de exames devem ser utilizadas apenas para esta pesquisa.

Declaro que as informações do questionário e os resultados dos exames podem ser utilizados para outras pesquisas, sem que seja necessário me informar.

Desejo ser contatada novamente caso haja interesse de utilizar minhas informações obtidas a partir do questionário e resultados de exames, para uma nova pesquisa.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura da participante da  
Pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador  
Ana Clara de Souza.