

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp

Faculdade de Medicina de Botucatu

Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal

Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex)

Trabalho de Conclusão de Curso

Dosagem de Anexina A1 em pacientes acometidas por candidíase vulvovaginal

Aluna: Verônica Cristina Guimarães Santos

Graduanda do 4º ano do Curso de Ciências Biomédicas, Instituto de Biociências, UNESP

Orientadora: Dra. Mariana de Castro Silva

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

**Botucatu
2023**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Dosagem de Anexina A1 em pacientes acometidas por candidíase vulvovaginal

VERÔNICA CRISTINA GUIMARÃES SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de bacharel em Ciências Biomédicas

Orientadora: Dra. Mariana de Castro Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

BOTUCATU

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Santos, Verônica Cristina Guimarães.

Dosagem de Anexina A1 em pacientes acometidas por candidíase vulvovaginal / Verônica Cristina Guimarães Santos. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Mariana de Castro Silva

Coorientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40103005

1. Anexina A1. 2. Células epiteliais. 3. Candidíase Vulvovaginal.

Palavras-chave: Anexina A1; Células do epitélio vaginal; Candidíase vulvovaginal.

SUMÁRIO

• Resumo	5
• Introdução e justificativa	6
• Objetivo	7
• Metodologia	7
• Resultados e discussão	9
• Conclusão	10
• Referências	11

RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é caracterizada pela infecção ocasionada por *Candida* spp., que provoca alterações inflamatórias na região do epitélio vaginal e vulvar, com estimativa de que 75% das mulheres apresentarão, ao menos, um episódio de candidíase em algum momento da vida. A evolução e persistência da candidíase podem estar relacionadas às condições da microbiota vaginal, resistência do patógeno ao tratamento e a resposta imunológica do hospedeiro. A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa contra patógenos, principalmente devido à presença de células fagocíticas, como macrófagos. A resposta imunológica no ambiente vaginal é produzida principalmente por meio da sinalização das células do epitélio vaginal (VEC). O mecanismo pelo qual as VEC realizam essa inibição ainda não é totalmente compreendido. Entre os possíveis mecanismos que podem estar associados a essa ação fungistática do epitélio vaginal, a Anexina A1 (AnxA1) parece desempenhar importante papel. **Objetivo:** Realizar a quantificação de Anexina A1 em amostras de lavado vaginal de mulheres em idade reprodutiva acometidas por candidíase vulvovaginal. **Metodologia:** Será realizado um estudo prospectivo, transversal, que incluirá mulheres atendidas no Ambulatório de Infecções Genitais Femininas do Complexo HCFMB. Pacientes com microbiota normal (Flora I) serão incluídas no estudo como grupo controle, enquanto que mulheres diagnosticadas com microbiota normal e presença de CVV formaram o grupo de infecção por candidíase. O diagnóstico de microbiota foi realizado pelo escore de Nugent e os sobrenadantes obtidos do lavado cervicovaginal foram utilizados para a determinação dos níveis de Anexina A1. **Resultados e conclusão:** Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de Anexina A1 nos grupos de mulheres com microbiota saudável na presença e ausência de candidíase vulvovaginal. Com este estudo destacamos a necessidade de aprofundar a investigação acerca do papel da Anexina A1 em mulheres acometidas por episódios de candidíase vulvovaginal, explorando o perfil pró-inflamatório e a capacidade da Anexina em regular esse perfil

Palavras-chave: Anexina A1, Células do epitélio vaginal, candidíase vulvovaginal

I. Introdução e Justificativa

A candidíase vulvovaginal (CVV) é caracterizada pela infecção ocasionada por *Candida* spp., que provoca alterações inflamatórias na região do epitélio vaginal e vulvar (1) e é responsável por cerca de 20 a 25% de todos os casos de vulvovaginites que acometem mulheres em idade reprodutiva (2), com estimativa de que 75% das mulheres apresentarão, ao menos, um episódio de candidíase em algum momento da vida (3). Diversos fatores de risco podem estar associados ao aparecimento da CVV, como a administração de certos medicamentos, principalmente os que levam a alterações hormonais, condições fisiológicas da paciente, comorbidades como diabetes e condições de imunossupressão (4).

As principais espécies do gênero *Candida*, associadas aos episódios de CVV, são espécies que naturalmente residem na microbiota vaginal saudável, com destaque para a *Candida albicans*, que representam de 85% a 95% os casos de candidíase (5). Porém, em condições favoráveis, a *Candida* spp. pode se tornar patogênica, desencadeando a resposta inflamatória local (6), com quimiotaxia leucocitária, que levam ao surgimento de sintomas como prurido, eritema e ardor na região vulvar, dispareunia e alteração do conteúdo vaginal. A evolução e persistência da candidíase podem estar relacionadas às condições da microbiota vaginal, resistência do patógeno ao tratamento e a resposta imunológica do hospedeiro (7,8).

A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa contra patógenos, principalmente devido a presença de células fagocíticas, como macrófagos, e células *natural killer* (NK), que podem atuar de forma direta na eliminação do patógeno, ou de forma indireta, através resposta imune adaptativa, por meio da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (9). A resposta imunológica no ambiente vaginal é produzida principalmente por meio da sinalização das células do epitélio vaginal (VEC), que apresentam em sua superfície os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), os quais estão associados a sinalização celular de cascatas inflamatórias e produção de citocinas como a interleucina (IL)-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Diversos trabalhos na literatura apontam que as VEC são capazes de reconhecer e diferenciar fungos comensais e patogênicos, sendo que a principal hipótese discutida é de que as próprias células do epitélio vaginal possuem atividade fungistática, limitando assim o desenvolvimento de infecções (10). Em um estudo de Barousse et al. (11) realizado com 92 mulheres em diferentes fases do ciclo menstrual, demonstrou que as células de epitélio vaginal foram capazes inibir a atividade da *Candida albicans*. O mecanismo pelo qual as VEC realizam essa inibição ainda não é totalmente compreendido, todavia acredita-se que não há envolvimento de fatores solúveis, fagocitose,

fosfolípidios e proteínas de superfície. A atuação das VEC em impedir a ação da *Candida albicans*, entretanto, é anulada pelo ácido periódico o que, por fim, indica o papel dos carboidratos de superfície.

Entre os possíveis mecanismos que podem estar associados a essa ação fungistática do epitélio vaginal, a Anexina A1 (AnxA1) parece desempenhar importante papel. Sua produção limita o recrutamento neutrofílico e a produção de citocinas pró-inflamatórias, modulando assim a resposta inflamatória, de forma a garantir a redução de danos às células e tecidos. Quando ativada, a AnxA1 atua inibindo a aderência de macrófagos e neutrófilos ao epitélio, além de limitar a produção de reguladores pró-inflamatórios, como por exemplo fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-1 β , IL-8, IL-12 e IL-6 (12,13,14). Diante desse cenário, e considerando a ausência de estudos que demonstrem a influência dessa proteína em casos de CVV, estudos são necessários para determinar o papel da Anexina A1 em casos de candidíase episódica em mulheres em idade reprodutiva.

II. Objetivo

Realizar a quantificação de Anexina A1 em amostras de lavado vaginal de mulheres em idade reprodutiva acometidas por candidíase vulvovaginal.

III. Metodologia

Casuística e coleta do lavado cervicovaginal

Foi realizado um estudo prospectivo, transversal, que incluiu 40 mulheres atendidas no Ambulatório de Infecções Genitais Femininas do Complexo HCFMB. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa local. Foram incluídas mulheres com idade mínima de 18 anos e que atenderam aos seguintes critérios de elegibilidade: estar na menacme, não gestante, ausência de tratamento de infecções do trato genital nos últimos 30 dias, estar em pausa sexual por, no mínimo, 72 horas e há 5 dias do fim da menstruação. Foram excluídas do estudo pacientes imunossuprimidas, transplantadas de órgãos sólidos, soropositivas para HIV e sífilis, e positivas para pesquisa endocervical de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e HPV, e aquelas com pesquisa vaginal positiva de infecção por *Trichomonas vaginalis*.

No momento da inclusão, foi realizado o exame especular, empregando-se o espéculo vaginal bivalve de Collins, esterilizado e isento de qualquer lubrificante, para coleta de conteúdo vaginal com swab estéril, para posterior classificação microscópica da microbiota vaginal e diagnóstico de CVV. Também foi realizada a coleta de lavado cervicovaginal, utilizando 3mL de solução fisiológica, para quantificação de Anexina A1 pela técnica de ELISA.

Pacientes com microbiota normal (Flora I) foram incluídas no estudo como grupo controle (N=20), enquanto que mulheres diagnosticadas com microbiota normal e presença de CVV (N=20) formaram o grupo de infecção por candidíase. O diagnóstico de microbiota foi realizado pelo escore de Nugent et al. (15). A caracterização dos morfotipos bacterianos que habitam o microambiente vaginal, bem como sua semi-quantificação no esfregaço vaginal corado pelo método de Gram, permitem o diagnóstico em um escore variando de 0 a 10, sendo que a somatória de 0 a 3 caracterizada como microbiota normal, 4 a 6 a microbiota intermediária e 7 a 10 a vaginose bacteriana.

Detecção da expressão proteica de Anexina A1 por ELISA

Os sobrenadantes obtidos do lavado cervicovaginal armazenados a -80°C foram utilizados para a determinação dos níveis de Anexina A1 (Human ANXA1 ELISA kit FineTets, cat EH0855) pelo método de ELISA sanduíche seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram centrifugadas a 1000g por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado no ensaio. Brevemente, foram adicionados 100µL de amostras, diluídas 1:2, e incubadas por 90 minutos a 37°C. Posteriormente foi adicionado anticorpo de detecção por 1 hora a 37°C. Após incubação com o anticorpo de detecção, foi adicionada estreptavidina. A reação foi revelada com TMB (Tetrametilbenzidina) e interrompida pela adição de 50µL de solução de parada. As densidades ópticas foram avaliadas em leitor automático de ELISA (Epoch, BioTek®), em comprimentos de onda de 450nm.

Análise Estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Foi empregado o teste não paramétrico de Mann Whitney para determinar as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram realizadas empregando-se o *software* GraphPad Prism (versão 8.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA).

IV. Resultados e discussão

Os níveis de Anexina A1 foram dosados em amostras de lavado cervicovaginal de pacientes que apresentaram microbiota vaginal em condições de presença e ausência de candidíase vulvovaginal. A mediana dos seus níveis, expressos em picogramas por mL, estão apresentados no gráfico abaixo (Figura 1). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nos níveis de anexina quando comparados os grupos de microbiota saudável na ausência de candidíase vulvovaginal com o grupo de mulheres acometidas pela infecção.

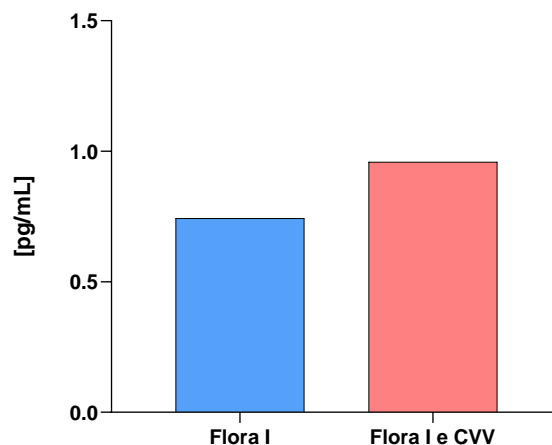


Figura 1. Níveis de Anexina A1 em amostras de lavados cervicovaginais. Os níveis da proteína Anexina A1 estão apresentados em picograma/mL; Teste de Mann Whitney; N=20/grupo

A Anexina A1, também conhecida como lipocortina-1, é uma proteína endógena de propriedade anti-inflamatória e que pode ser expressa por diferentes tipos celulares, como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (16, 17). Durante o processo infeccioso causado por *Candida* spp., incluindo as infecções vulvovaginais, foi observado um recrutamento neutrofílico regulado por Anexina A1 endógena, incluindo alterações no metabolismo lipídico da membrana, fornecendo assim a primeira linha de defesa contra patógenos (17). No entanto, para que haja uma resolução adequada da inflamação, esse aporte de polimorfonucleares deve ser regulado pelo sistema imunológico, a fim de evitar danos aos tecidos. Nesse cenário, estudos têm demonstrado o papel da Anexina A1 como uma proteína contra regulatória de eventos pró-inflamatórios, através de suas propriedades de reduzir o aporte leucocitário e auxiliar no processo de apoptose de neutrófilos (13).

No presente estudo os níveis de anexina não apresentaram diferença estatística no grupo de mulheres acometidas por candidíase vulvovaginal quando comparado ao grupo de pacientes sem o patógeno, o que pode ser explicado pelo reduzido número de mulheres incluídas no estudo. Além disso, outra limitação do nosso estudo é a falta de análise de outras citocinas pró-inflamatórias,

como a Interleucina (IL)-6 e o Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , pois em casos de deficiência de Anexina A1 já foi demonstrado que os níveis dessas citocinas estavam aumentados (18). Estudos futuros serão realizados para que essas limitações sejam resolvidas.

V. Conclusão

Este estudo destaca a necessidade de aprofundar a investigação acerca do papel da Anexina A1 em mulheres acometidas por episódios de candidíase vulvovaginal, explorando o perfil pró-inflamatório e a capacidade da Anexina em regular esse perfil.

VI. Referências

1. Itriyeva K. Evaluation of vulvovaginitis in the adolescent patient. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2020 Jul;50(7):100836. doi: 10.1016/j.cppeds.2020.100836. Epub 2020 Aug 8. PMID: 32778468.
2. Paladine HL, Desai UA. Vaginitis: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2018 Mar 1;97(5):321-329. PMID: 29671516.
3. Fidel PL Jr. Immunity in vaginal candidiasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2005 Apr;18(2):107-11. doi: 10.1097/01.qco.0000160897.74492.a3. PMID: 15735412.
4. Mtibaa L, Fakhfakh N, Kallel A, Belhadj S, Belhaj Salah N, Bada N, Kallel K. Vulvovaginal candidiasis: Etiology, symptomatology and risk factors. *J Mycol Med*. 2017 Jun;27(2):153-158. doi: 10.1016/j.mycmed.2017.01.003. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28314677.
5. SOBEL, Jack D. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet**, [S.L.], v. 369, n. 9577, p. 1961-1971, 09 jun. 2007. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)60917-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(07)60917-9).
6. COSTA, Ivete Conchon; FELIPE, Ionice; GAZIRI, Luis Carlos Jabur. Resposta imune a *Candida albicans*. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 1, n. 29, p. 27-40, jun. 2008.
7. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol*. 2016 Nov;42(6):905-27. doi: 10.3109/1040841X.2015.1091805. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26690853.
8. Sobel JD, Sobel R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. *Expert Opin Pharmacother*. 2018 Jun;19(9):971-977. doi: 10.1080/14656566.2018.1476490. Epub 2018 Jun 22. PMID: 29932786.
9. Villa P, Cipolla C, D'Ippolito S, Amar ID, Shachor M, Ingravalle F, Scaldaferrri F, Puca P, Di Simone N, Scambia G. The interplay between immune system and microbiota in gynecological diseases: a narrative review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 May;24(10):5676-5690. doi: 10.26355/eurrev_202005_21359. PMID: 32495903.
10. Barousse MM, Espinosa T, Dunlap K, Fidel PL Jr. Vaginal epithelial cell anti-*Candida albicans* activity is associated with protection against symptomatic vaginal candidiasis. *Infect Immun*. 2005 Nov;73(11):7765-7. doi: 10.1128/IAI.73.11.7765-7767.2005. PMID: 16239581; PMCID: PMC1273905.
11. Barousse MM, Steele C, Dunlap K, Espinosa T, Boikov D, Sobel JD, Fidel PL Jr. Growth inhibition of *Candida albicans* by human vaginal epithelial cells. *J Infect Dis*. 2001 Dec 1;184(11):1489-93. doi: 10.1086/324532. PMID: 11709796.
12. Kelly L, McGrath S, Rodgers L, McCall K, Tulunay Virlan A, Dempsey F, Crichton S, Goodyear CS. Annexin-A1: The culprit or the solution? *Immunology*. 2022 May;166(1):2-16. doi: 10.1111/imm.13455. Epub 2022 Mar 1. PMID: 35146757; PMCID: PMC9426623.
13. Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, Sousa LP. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *J Immunol Res*. 2016;2016:8239258. doi: 10.1155/2016/8239258. Epub 2016 Jan 13. PMID: 26885535; PMCID: PMC4738713.
14. Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari E, Parente L. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol*. 2003 Oct;3(10-11):1363-9. doi: 10.1016/S1567-5769(03)00133-4. PMID: 12946433.

15. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991 Feb;29(2):297-301. doi: 10.1128/jcm.29.2.297-301.1991.
16. Oliani SM, Perretti M. Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1 during experimental inflammatory response. *Ital J Anat Embryol.* 2001;106(2 Suppl 1):69-77. PMID: 11729999.
17. Sanches JM, Rossato L, Lice I, Alves de Piloto Fernandes AM, Bueno Duarte GH, Rosini Silva AA, de Melo Porcari A, de Oliveira Carvalho P, Gil CD. The role of annexin A1 in *Candida albicans* and *Candida auris* infections in murine neutrophils. *Microb Pathog.* 2021 Jan;150:104689. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104689. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33307121.
18. Yona S, Heinsbroek SE, Peiser L, Gordon S, Perretti M, Flower RJ. Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages. *Br J Pharmacol.* 2006 Jun;148(4):469-77. doi: 10.1038/sj.bjp.0706730. Epub 2006 Apr 24. PMID: 16633358; PMCID: PMC1751776.