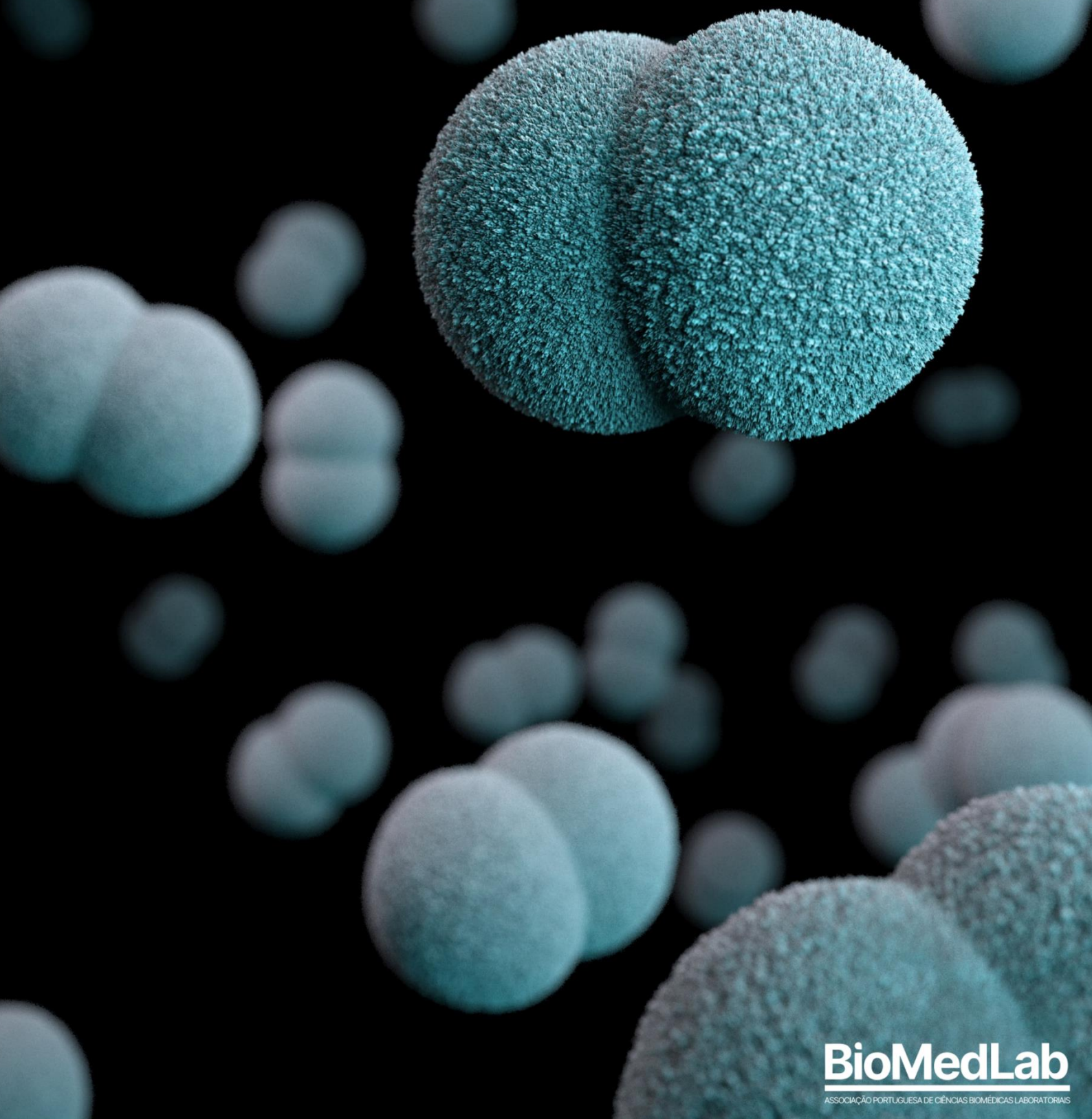


TRENDS IN
**Biomedical
Laboratory Sciences**



TRENDS IN
**Biomedical
Laboratory Sciences**

Ficha Técnica

Trends in Biomedical laboratory
Sciences
Volume 1, N.º1, 2023

Periodicidade

Anual

Direcção/Edição

Diana Martins

Conselho Editorial

Fernando Mendes

Josiana Vaz

Rúben Roque

Sílvia Fernandes

Vera Calhau

Propriedade

BioMedLab- Associação Portuguesa de
Ciências Biomédicas Laboratoriais

Imagem e Comunicação

Carolina Melo

Raquel Lopes

Contacto

revista@abiomedlab.org

Editorial 1

Destaque:

The crosstalk between the microbiome and
Bladder Cancer 5

The most frequent placental pathology in
fetal deaths 19

Not using phosphomolybdic acid in
Masson's trichrome: A safer alternative
protocol for improving collagen staining? 30

A importância do microbioma da pele na
dermatite atópica: Revisão sistemática 38

CINtec® PLUS no diagnóstico do cancro do
colo do útero no centro hospitalar
universitário do algarve 51

Rastreio do cancro do colo do útero dos
Açores - a mudança de paragrma 64

Editorial

O conhecimento é poder... quando partilhado!

Num tempo de grandes mudanças e de desenvolvimento científico e tecnológico acelerado, a Trends in Biomedical Laboratory Sciences surge com o intuito de agregar todas as áreas da Biomedicina Laboratorial. Pretende evidenciar-se como uma plataforma para a partilha e disseminação de conhecimento inovador ao nível da investigação, diagnóstico, tratamento e monitorização da doença, assim como controlo da qualidade e gestão laboratorial que são valiosos para a prática das Ciências Biomédicas Laboratoriais.

O patamar de desenvolvimento atingido ao nível da formação académica e profissional nas Ciências Biomédicas Laboratoriais e nestes profissionais de saúde obriga à constante atualização de conhecimentos, partilha de boas práticas e inovação tecnológica. Neste contexto, surge a Trends in Biomedical Laboratory Sciences.

Neste primeiro número da Revista foi lançado um convite às Escolas Públicas e Privadas que formam na área das Ciências Biomédicas Laboratoriais, onde estudantes, profissionais e docentes colaboraram neste projeto. O caminho faz-se caminhando e neste sentido é premente a consciencialização que todos são importantes, apelando aos profissionais, estudantes e docentes que transmitam e

partilhem o conhecimento através da Trends in Biomedical Laboratory Sciences.

Merece ainda destaque, neste primeiro número, o I Congresso da BioMedLab, em 2023 na Alfândega do Porto. No espírito de união e partilha, a Trends in Biomedical Laboratory Sciences desenhou um Suplemento no qual constam as comunicações orais e posters apresentados no Congresso.

A equipa da Trends in Biomedical Laboratory Sciences não pode deixar de agradecer à BioMedLab pela visão de divulgação e partilha de conhecimento e simultaneamente a confiança na equipa editorial.

Um agradecimento a todos os parceiros que tornaram possível a edição deste primeiro número.

Finalmente, uma palavra em especial para os principais atores de uma revista, que são os seus leitores e os autores. Para os leitores posso garantir que iremos colocar todos os nossos esforços para disseminar as melhores práticas na área das Ciências Biomédicas Laboratoriais, comprometidos com os princípios de qualidade, integridade e liberdade criativa. Quanto aos autores, peço que façam da Trends in Biomedical Laboratory Science, a vossa revista de eleição, desafiando-os a manterem viva a chama da ciência e do conhecimento nas Ciências Biomédicas Laboratoriais!

Editora
Diana Martins



TRENDS IN Biomedical Laboratory Sciences



Your Fast Track to the Ultramodern Lab



Inify Laboratories provides cancer diagnostics through ultra-modern laboratory services within pathology. Its fully digital, standardized and AI-supported workflow is designed to optimize quality and response times, initially within prostate.

“Allowing the histopathological process to guide the laboratory’s physical setup has been an incredible experience.”

Emelie Edvigsson
Laboratory Manager



The service includes the whole chain of sample handling: from logistics, to sample preparation, to reporting. Diagnostic reports are assisted by our own AI, proven in clinical studies to have world-leading accuracy. The entire workflow has been developed together with lab technicians for ultimate ease of use.

Cross-professional innovation

In less than a year, Inify has created a laboratory that will be ready to receive its first samples as soon as summer of 2023.

An essential asset in the project has been the uniquely close collaboration between different competences within the company: lab technicians, software developers, sales, AI scientists and management. Knowledge sharing has been a top priority throughout the process, and several of the laboratory’s inno-

Uncompromising quality

In order to guarantee consistently superior image quality, we have put immense effort into streamlining our entire laboratory procedure.

Upon arrival at our lab facility, each specimen is prepared for diagnosis using cutting-edge equipment, operated by our experienced and quality-focused biomedical scientists.

All steps – grossing, embedding, dehydration, cutting, staining and scanning – are continuously calibrated and quality assured, and the complete workflow is supported by a tailor-made process control system. From start to finish, you can trust that we leave nothing to chance.

Based in Sweden, our lab will initially handle biopsy samples from the Nordic region, but is dimensioned to receive specimens from anywhere in



Want to know more?

Visit www.inify.com or contact us at info@inify.com

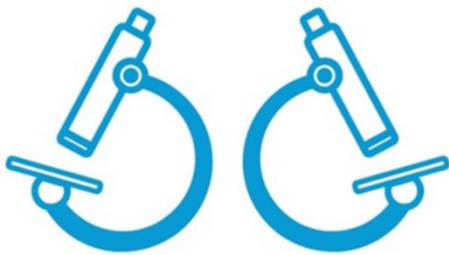


Inify
Laboratories

TRENDS IN
**Biomedical
Laboratory Sciences**



enzifarma



DUARTE CLARA

ASSISTÊNCIA TÉCNICA A MICROSCOPIA

EMPRESA CERTIFICADA

eic

NP 4492

Prestação de Serviços de Manutenção

MANUTENÇÃO A MICROSCÓPIOS

TODAS AS MARCAS E TÉCNICAS UTILIZADAS



www.duarteclara.pt

TRENDS IN
Biomedical
Laboratory Sciences



Review

THE CROSSTALK BETWEEN THE MICROBIOME AND BLADDER CANCER

Catarina Camacho¹, Vera Calhau^{1,2}, Edgar Tavares Silva^{3,4,5,6}, Diana Martins^{1,3,4,5}, Fernando Mendes^{1,3,4,5,7*}

¹ Politécnico de Coimbra, ESTeSC, UCPCBL, Rua 5 de Outubro - SM Bispo, Apartado 7006, 3046-854 Coimbra, Coimbra, Portugal; catarinac1999@gmail.com (C.M.) diana.martins@estesc.ipc.pt (D.M.), fjmendes@estescoimbra.pt (F.M.)

² Clinical Pathology Department, Coimbra Hospital and University Center, Coimbra, Portugal; vmcalhau@chuc.min-saude.pt (V.M.)

³ University of Coimbra, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (ICBR) area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), Biophysics Institute of Faculty of Medicine, Coimbra, Portugal; edtavares@fmed.uc.pt (E.T.-d.-S.);

⁴ University of Coimbra, Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), Coimbra, Portugal;

⁵ Clinical Academic Center of Coimbra (CACC), Coimbra, Portugal;

⁶ Department of Urology and Renal Transplantation, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC); Praceta Prof. Mota Pinto, Celas; 3000-075 Coimbra, Portugal;

⁷ European Association for Professions in Biomedical Sciences, Belgium, Brussels.

* fjmendes@estesc.ipc.pt

Abstract: Cancer is among the main causes of death worldwide, at urinary tract (UT) level, bladder cancer (BC) is the most common type of cancer. There's a growing interest in new factors contributing to the origin, development, and progression of BC. One of them is the bladder microbiome. This systematic review aims to study the urinary microbiome in healthy individuals and in BC cases and understand how the bladder microbiome may be an asset on an earlier diagnosis and be used as a target for BC therapy. The "PubMed/MEDLINE" data base was used. Papers were selected following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist. The selected keywords were "Dysbiosis", "Microbiota", "Urinary Tract", "Urine", and "Urologic Neoplasms". The study was carried out for all articles obtained from between 2011 and August 2021. Nine eligible studies were included in this study. Results suggest that advances in 16S rRNA sequencing showed the presence of bacteria in the urine. The main bacteria found were genera *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Escherichia-Shigella* and *Streptococcus*. There are differences between a healthy urinary microbiome and a BC urinary microbiome. The main difference is bacterial richness, certain microorganisms can play a protective role and others that are harmful, mainly inducing inflammatory states being precursors of carcinogenesis. BC development is associated with exposure to risk factors associated with microbiome alteration – dysbiosis – that creates an environment for cancer development.

Keywords: Dysbiosis, microbiota, urinary tract, urine, urologic neoplasms.

Citation: Camacho, C.; Calhau, V.; Tavares Silva, E.; Martins, D.; Mendes, F. The Crosstalk between the Microbiome and Bladder Cancer. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2023 Mar 11;1(1):5-17.

Academic Editor: Diana Martins

Received: 27 January 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 11 March 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences.

1. Introduction

Cancer is the second leading cause of death worldwide (1). Its incidence and mortality rates are increasing due to the growth of the ageing population and consequently higher exposure to risk factors (2).

BC is the 10th most common type of cancer, counting 573 278 new cases and 212 536 deaths spread out in the World (3). BC affects about four times more men than women and it's the 6th most common cancer type among men worldwide (2,3). Approximately 90% of BC cases are diagnosed in people aged 55 years or older (3).

Statistics reveal that Portugal shows a BC incidence of 4.3% of the total amount of new cases (4). The main risk factor for BC is smoking, accounting for 50% to 65% of the total cases (1). In addition to this, other factors are occupational or environmental exposures (1). Because of that, its incidence is higher in developed countries (2). This type of cancer may occur years after exposure (2). In underdeveloped countries (more specifically, Africa and the Middle East), Schistosomiasis infection is a BC common cause (1,4). Schistosomiasis is a parasitic disease caused by flatworms (*S. haematobium*) that live in snail-infested freshwater (4). Recently, host genetic

factors were also associated with BC development (e.g., slow acetylation of N-acetyltransferase, a key enzyme in aromatic amines metabolism) (5).

BC originates normally at the urothelium which corresponds to the first six to seven cell layers from the organ's internal surface (6). Cells located in this area, are called urothelial cells, and they are in contact with urine and therefore exposed to different mutagenic agents (3).

So far, urine used to be considered sterile, however, in 2008 emerged the Human Microbiome Project, expected to develop a comprehensive characterization of the human microbiome with a deep analysis of its role in human health and disease (7). Initially, due to a lack of knowledge of an existing urinary microbiome, the bladder was not included in it, however, advances in culture methods and molecular biology techniques (16S ribosomal RNA (rRNA) gene sequencing, shotgun sequencing, and mass spectrometry) identified a specific UT microbiome (8–11) that revealed the presence of bacteria in urine, undetectable by standard culture methods (12).

At the UT level, the bladder's microbiome characterization can be obtained on both tissues (removed by transurethral resection) and urine samples (collected by bladder washouts, mid-stream void, catheter collected urine) avoiding sample contamination with microorganisms from the urethra (5,10,13–15).

In healthy individuals, the bladder microbiome may show different composition types that are related to gender, age, and inter-individual variability (11,16). Other significant changes in the bladder microbiome are related to some diseases such as type 2 diabetes mellitus, sexually transmitted infections, or chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (11). Recent evidence has shown that the onset and development of BC are associated with changes in the microbiome (16). For example, species from *Thermoactinomyces* and *Shingobacteriaceae* families show increased values in BC patients (16).

Considering this and understanding the potential that bladder microbiome knowledge may have, this systematic review arises, aiming to study the urinary microbiome in healthy individuals and compare it with BC cases. Parallely, it also aims to understand how the bladder microbiome may be an asset on an earlier diagnosis and how the microbiome can be used as a target on BC therapeutics adjusting them to improve treatment efficacies.

2. Materials and Methods

This systematic review without meta-analysis will be reported in English. The included papers were selected following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist (17).

The literature used is available on the indexed search database "PubMed/MEDLINE". The selected keywords were "Dysbiosis", "Microbiota", "Urinary Tract", "Urine", and "Urologic Neoplasms", according to the Medical Subject Headings (Mesh). For the research, the Mesh Terms were combined as follow: ((urinary tract[MeSH Terms] OR microbiota[MeSH Terms]) AND (urologic neoplasm[MeSH Terms] OR urine[MeSH Terms]) AND (dysbiosis[MeSH Terms] OR urine[MeSH Terms])), ((urologic neoplasm[MeSH Terms] AND microbiota[MeSH Terms]) OR (urinary tract[MeSH Terms] and microbiota[MeSH Terms]) OR (urine[MeSH Terms] AND microbiota[MeSH Terms])), ((urologic neoplasm[MeSH Terms] OR microbiota[MeSH Terms]) AND (urinary tract[MeSH Terms] OR microbiota[MeSH Terms]) AND (urine[MeSH Terms] or microbiota[MeSH Terms])), (Urinary Tract[MeSH Terms]) AND (Microbiota[MeSH Terms]),(Urine[MeSH Terms]) OR ((Urinary tract[MeSH Terms] AND (Microbiota[MeSH Terms])), (urine[MeSH Terms]) AND (microbiota[MeSH Terms]), (urinary tract[MeSH Terms]) AND (urine[MeSH Terms]), (urologic neoplasm[MeSH Terms]) AND (microbiota[MeSH Terms]), (dysbiosis[MeSH Terms]) AND (urine[MeSH Terms])).

Only articles published between 2011 and 2021 (publication date equal to or less than 10 years) were included in this review. All articles found were identified, analyzed, and selected according to the inclusion and exclusion criteria established to guarantee the relevance and validity of the information. Inclusion criteria comprised scientific articles, clinical trials in humans, randomized controlled trials and systematic reviews. Only Free Full-Text articles were considered. Additionally, manuscripts were excluded if they were not in English, and titles and abstracts were skimmed to exclude the articles whose content did not fit the approached subject. The articles not focused on humans were also excluded.

3. Results

The literature flow diagram (Figure 1) summarizes the search and selection of articles. Database searches resulted in nine eligible articles.

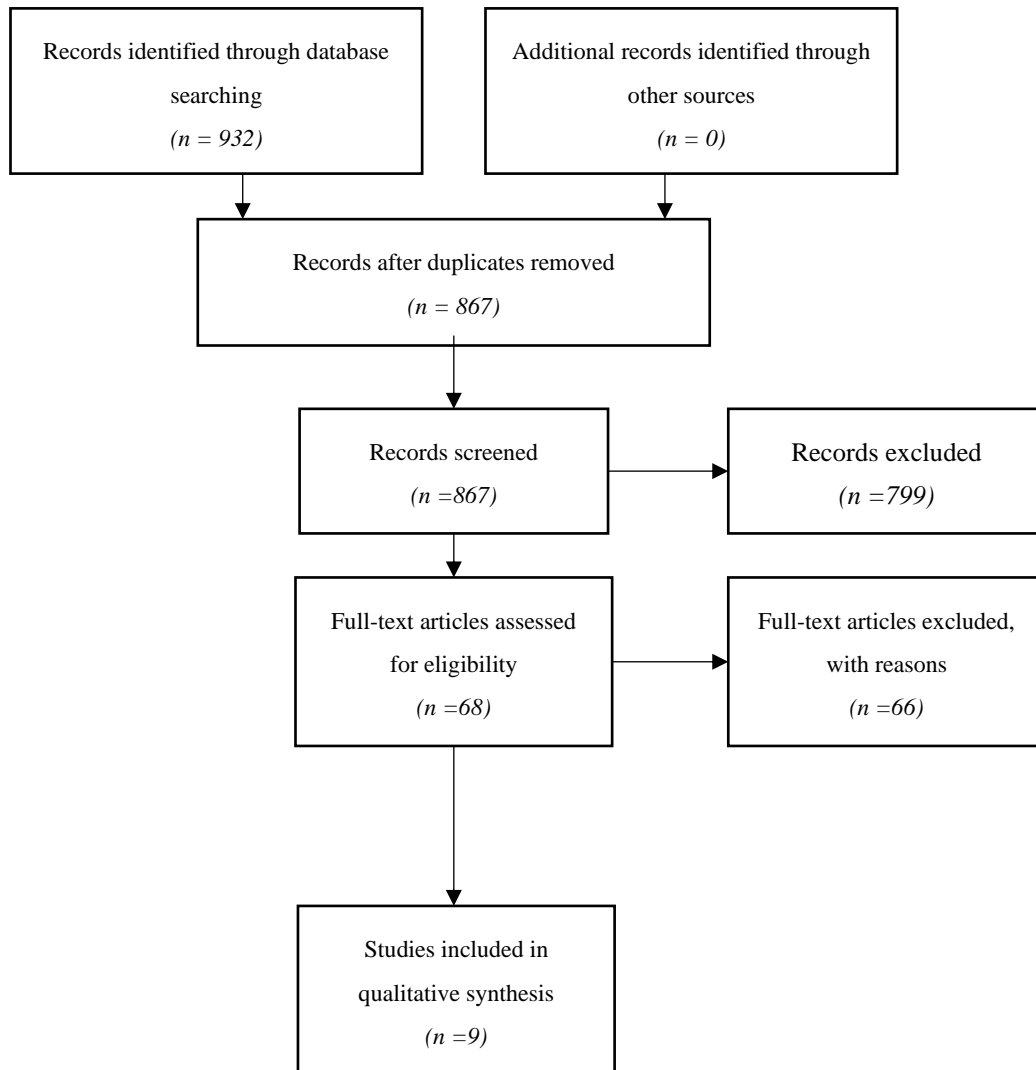


Figure 1. PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) flow chart for systematic review.

The main characteristics and key observations from these articles were summarized in Table 1.

Table 1: Main Characteristics and key-observations summary obtained from the nine eligible articles selected for review in this Systematic Review.

Ref.	Author	Patients	Parameter Assessed	Sample collection method	Analysis technique	Relevant Bacteria	Key Observations
(18)	E. Hilt, et al. (2014)	65 Urine Samples (41 patients with overactive bladder + 24 control)	Urinary Microbiome	Transurethral catheterization	Standard urine Culture EQUC 16S rRNA sequencing	<i>Actinobaculum schaalii</i> , <i>Actinomyces neuii</i> , <i>Aerococcus urinae</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Corynebacterium coyleae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Facklamia hominis</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus jensenii</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Oligella urethralis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae/mitis/oralis</i> , <i>Trueperella bernardiae</i>	- Urine is not sterile and Urinary Microbiome exists. - This study provided evidence of live bacteria in the adult female bladder and demonstrated a correlation between the bacteria isolated using EQUC and the bacteria identified by 16S rRNA gene sequencing.
(12)	A. Wolfe, et al. (2012)	89 Urine samples were collected from 9 female adults.	Urinary Microbiome	Transurethral catheterization Voided urine	16S rRNA gene sequencing	<i>Fingoldia magna</i> , <i>Uncultured bacterium</i> , <i>Atopobium vaginae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Prevotella timonensis</i> , <i>Prevotella bergensis</i> , <i>Prevotella buccalis</i> , <i>Lactobacillus iners</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> .	- growth of bacteria on 33% of standard cultures when compared to the 16S rRNA gene sequencing.
(19)	D. Lewis, et al. (2013)	Samples collected from 6 male patients and 10 female patients	Urinary Microbiome	Midstream urine	16S rRNA gene sequencing	Identified Phyla: <i>Acidobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Cyanobacteria</i> / <i>Chloroplast</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Fusobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Synergistetes</i> and <i>Tenericutes</i> . Identified Genera: <i>Actinobaculum</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Anaerosphaera</i> , <i>Atopobium</i> ,	- Researchers identified other commensal bacteria that showed proof of an existing urine microbiome.

						<p><i>Campylobacter,</i> <i>Corynebacterium, Dialister,</i> <i>Enterobacter,</i> <i>Enterococcus, Facklamia,</i> <i>Finegoldia, Fusobacterium,</i> <i>Lactobacillus, Mobiluncus,</i> <i>Murdochiella,</i> <i>Negativicoccus,</i> <i>Peptoniphilus,</i> <i>Porphyromonas, Prevotella,</i> <i>Propionimicrobium,</i> <i>Sporanaerobacter,</i> <i>Streptococcus, Varibaculum.</i></p>	
(20)	C. Gottschick, et al. (2017)	188 Urine Samples from Men, and Women with Bacterial Vaginosis	Urinary Microbiome	Midstream urine	16S rRNA gene sequencing	<p><i>Prevotella amnii; Sneathia amnii; Gardnerella vaginalis; Atopobium vaginae; Lactobacillus iners; Shigella sonnei; Escherichia coli; Enterococcus faecalis; Streptococcus agalactiae; Citrobacter murlinae; Lactobacillus crispatus; Chitinophagaceae,</i></p>	<p>- The vagina and bladder harbor distinct microbial communities - Urinary Microbiome found in men was a subgroup form the female Urinary Microbiome and not a separate cluster - Species were found both to be protective and harmful depending on the health condition.</p>
(21)	L. Bossa, et al. (2017)	25 samples from three individuals	Urinary Microbiome	Catheterization (Suprapubic, Indwelling urethral)	16S rRNA gene sequencing	<p><i>Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Actinobacteria</i></p>	<p>- Microbial community can be an asset to monitor the health status of patients</p>
(5)	B. Mansour, et al. (2020)	24 Samples were collected from cancer patients, these samples were a	Urinary Bladder Microbiome	Tissue samples (collected from patients during cancer tissue removal by transurethral resection) Urine samples	16S rRNA Gene sequencing	<p>Urine samples collected, shown <i>Firmicutes as the</i> most abundant phyla, followed by <i>Proteobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria and Bacteroidetes,</i> tissue samples shown that most abundant</p>	<p>- Increased compositional abundance of some bacterial genera compared to the urine of healthy patients, leads to the thought that the</p>

			combination of 10 urine samples and 14 tissue samples.	(obtained by transurethral resectoscopy)		phyla by order from the highest to the lowest was, <i>Firmicutes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> and <i>Cyanobacteria</i> .	urinary microbiome can be an asset in future diagnosis and treatment.
(11)	V. Popović, et al. (2018)	Urinary Bladder Microbiome	Samples were collected from 36 patients, 12 Bladder Cancer Patients and 11 Healthy Patients (Controls)	Tissue samples (collected from patients during cancer tissue removal by transurethral resection) Clean-catch midstream urine	16S rRNA gene sequencing	Bladder cancer patients microbiome was mostly composed by the <i>Fusobacterium</i> , <i>Actinobaculum</i> , <i>Facklamia</i> and <i>Campylobacter</i> genera, and two OTUs belonging to <i>Ruminococcaceae</i> family that were further identified as <i>Subdoligranulum</i> and <i>Ruminococcaceae</i> . In healthy bladders' microbiome the most present bacteria were from genus <i>Veillonella</i>	- Results show that the most abundant phylum in both sample groups was <i>Firmicutes</i> , followed by <i>Actinobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> and <i>Proteobacteria</i> . - In an independent sample of 42 bladder cancer tissues, 11 had <i>Fusobacterium nucleatum</i> sequences detected by 16S rRNA gene sequencing
(22)	P. Wu, et al. (2018)	Urinary Bladder Microbiome	60 samples were collected: 35 from bladder of cancer patients and 25 from healthy patients (controls).	Clean-catch midstream urine	16S rRNA gene sequencing	The urinary microbiota was dominated by <i>Proteobacteria</i> and <i>Firmicutes</i> , followed by <i>Actinobacteria</i> and <i>Bacteroidetes</i> . However, on a familie and genus level respectively <i>Sphingobacteriaceae</i> and <i>Acinetobacter</i> were more abundant in cancer patients. On the other hand healthy patients presented an abundant amount of the following bacterial families: <i>Thermoactinomycetaceae</i> , <i>Serratia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Laceyella</i> . Also found to be associated with bladder cancer were higher compositional abundances of	-The urinary microbiota was dominated by <i>Proteobacteria</i> (39.7% cancer, 49.0% control) and <i>Firmicutes</i> (32.8% cancer, 28.1% control), followed by <i>Actinobacteria</i> (7.0% cancer, 6.2% control) and <i>Bacteroidetes</i> (3.9% cancer, 9.4% control); - LEfSe, identified in patients with bladder cancer, a significantly higher compositional

					<i>Anaerococcus, Rubrobacter,</i>	abundances of
					<i>Atopostipes, Geobacillus.</i>	<i>Acinetobacter,</i>
						<i>Anaerococcus,</i>
						<i>Rubrobacter,</i>
						<i>Sphingobacterium,</i>
						<i>Atopostipes,</i>
						<i>Geobacillus.</i>
					<i>Escherichia coli;</i>	
					<i>Staphylococcus aureus;</i>	
					<i>Corynebacterium spp.;</i>	
					<i>Pseudomonas aeruginosa;</i>	
					<i>Klebsiella oxytoca;</i>	
					<i>Streptococcus viridans;</i>	- Essential
					<i>Group B Streptococcus;</i>	components of
					<i>Klesiella pneumoniae;</i>	normal host innate
					<i>Staphylococcus spp;</i>	immune responses
					<i>Actinomyces meyeri; Proteus</i>	that limit infection.
					<i>mirabilis; Pseudomonas</i>	
					<i>aeruginosa (strain 1);</i>	
					<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
					<i>(strain 2); Lactobacillus</i>	
					<i>(strain 1); Lactobacillus</i>	
					<i>(strain 2); Escherichia coli</i>	
					<i>(strain 2);</i>	

3.1 Urine is not Sterile

So far, the microbiome has been poorly described due to the institutionalized dogma that “normal urine is sterile” (18). However, emerging evidence shows that the urinary tract has a microbiome (18). Considering that an existing urinary microbiome is a reality, E. Hilt *et al.* proposed that bacterial members of the urinary microbiota are not reported in routine urine cultures either because the number of organisms present is below the culture threshold of 10³ colonies forming unit (CFU)/ml or because the growth of these bacteria required special culture conditions, such as anaerobic atmosphere, incubation in an increased CO₂ environment, or prolonged incubation time (18). E. Hilt *et al.* study was conducted with guidelines to determine if the urinary microbiome was the product of living microbiota that consisted largely of organisms that would be missed by routine clinical microbiology culture practices (18). To prevent this from happening, a greater volume of urine was plated, the incubation was made in various atmospheric conditions and the period of incubation was extended (18). Urine was collected via transurethral catheter from participants (18). Sixty-five specimens were examined using both the standard and enhanced quantitative urine culture (EQUC) techniques (18). Standard urine culture protocol has shown that 80% of specimens (52/65) presented bacterial growth, but the majority of this (92%) were reported as no-growth at 10³ (18) (Table 1). On the other hand, the EQUC technique, allowed the isolation of bacteria from 35 different genera and 85 different species, with the most prevalent genera isolated being *Lactobacillus* (15%), followed by *Corynebacterium* (14%), *Streptococcus* (11.9%), *Actinomyces* (6.9%), and *Staphylococcus* (6.9%) (18). Within each genus, the most frequently isolated species were *Lactobacillus gasseri*, *Corynebacterium coyleae*, *Streptococcus anginosus*, *Actinomyces neuii*, and *Staphylococcus epidermidis*. Other genera commonly isolated included *Aerococcus*, *Gardnerella*, *Bifidobacterium*, and *Actinobaculum* (18). The presented study has provided evidence of live bacteria in the adult female bladder (18) (Table 1). These findings support the assertion that urine is not sterile, and that the urinary microbiome exists (18) (Figure 2).

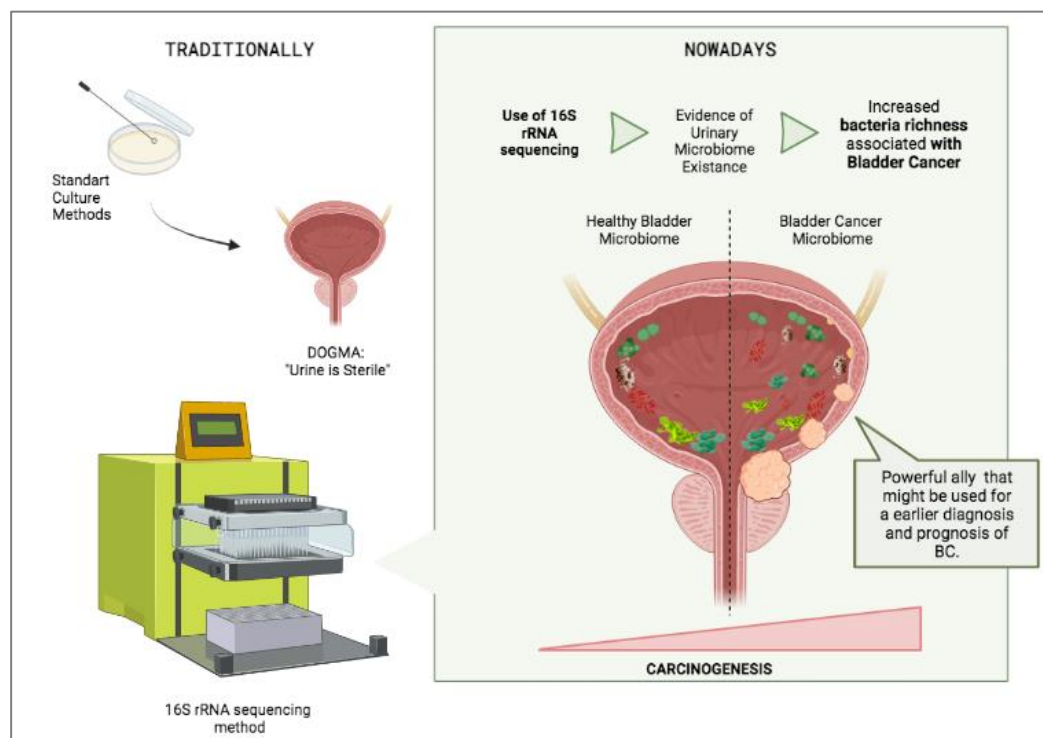


Figure 2. The most recent discoveries involving the Crosstalk Between the Microbiome and BC: Initially, standard culture methods couldn't identify the existence of a urinary microbiome. Creating the dogma that urine is sterile. However, the molecular method 16S rRNA sequencing was able to provide evidence of an existing living urinary microbiome. Differences found between a healthy bladder and a bladder with cancer were on the general bacterial richness that was increased on the bladder with cancer. Nowadays, the challenge it's to establish the relation between bacterial dysbiosis and development of BC.

Lewis *et al.* also identified 94 different genera with only 31 likely to be routinely cultivated by standard urine culture methods (19) (Table 1). Regarding the other 64 different genera, they were found using molecular methods. Based on these results, it's important to state that there's a huge difference between bacteria that can be detected by standard culture and by molecular methods (19). This raises questions on the precision of the methods used in the routine microbiological diagnostic: if clinicians are inaccurately informed of the presence/absence and quantification of bacteria, it might bring serious implications in any treatment plan made for those patients (19).

The bacterial community identified in the multiple clinical trials reviewed in this systematic review is believed to contribute to diverse human health and disease states (12). The samples analyzed by Wolfe *et al.* revealed that bacterial bladder communities of different types do exist in women, although not in all individuals studied (12). The two most abundant genera reported in this study were *Aerococcus* (50.48% in TUC) and *Actinobaculum* (17.34% in TUC), and additionally, a much smaller amount corresponded to *Escherichia/Shigella* (0.94% in TUC) (12) (Table 1). These results clearly show that the urine is not sterile, and "culture-negative" or "insignificant growth" can contain a varied bacterial community that can only be detected by using molecular methods (12). The fact that we may or may not detect bacteria in the urine is very interesting and might be linked to various human health conditions (12). As this field advances, important clinical questions can be addressed using optimized techniques and larger cohorts of appropriately selected subjects (12). There's a high possibility that diverse bacteria can exist within the urinary tract and play an important role in urinary tract health and disease, although this remains poorly understood (12). Further studies are important to identify at-risk populations and individuals (12).

Also in this study, samples from both genders were analyzed and they concluded that different genders have different genera of bacteria present in their urine (19). In both males and females, the main genera bacteria found belonged to the phylum *Firmicutes*, while bacteria from phyla *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* lacked in the male samples (19) (Table 1). It's important to note that it was possible to observe for the first time, the detection of a bacteria from the genus *Soehngenia* in a human sample (19). This *bacterium* was identified in four of the subjects in the

clinical trial, one male and three females (19). Anaerobic bacteria from this genus would not be detected by standard methods (19).

3.2 Changes in the urinary tract microbiome

Also, different health status is associated with the specific microbiome and may influence disease processes (19). For this reason, several studies are reporting the different health conditions and the microbiomes which are associated with them.

The urotype term was first introduced in 2014 in a study by Pearce *et al.*, where was identified six different urotypes (18). A study performed in 2017 described the urinary microbiome of healthy men and women, and women with Bacterial Vaginosis (BV) (20). According to this study results, nine urotypes were identified (Table 2, for complete urotype description) (20). Moreover, all except two urotypes were shared between men and women. These two were present only in healthy women urotype (20). Additionally, urotype seven, which was mainly composed of *Lactobacillus crispatus* was only present in healthy women, and urotype nine composed more abundantly by operational taxonomic units of *Chitinophagaceae* was only found after treatment with metronidazole (20). The urinary microbiome can therefore suffer changes because of our daily routine, changes in our diet or utilization of prescribed antibiotics making the bladder more susceptible to dysbiosis (20).

Differently than expected, no male characteristic urotypes of the urinary microbiome were found (20). Particularly, the urinary microbiome found in men was a subgroup of the female urinary microbiome and not a separate cluster (20). With this study, they were able to confirm that urinary microbiome is dominated by *Lactobacillus* spp., *Gardnerella* spp., *Sneathia* spp. and *Enterobacteriaceae* (20). Due to the taxonomic high resolution of this study, additional urotypes were found which were composed of *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Sneathia amnii*, and *Shigella sonnei*, and *Escherichia coli* (20). These data showed a complex difference between the healthy urinary microbiome and the diseased urinary microbiome (20). For example, *Lactobacillus* sp. was described as protective or harmful depending on the health condition (20). The results support the idea that some bacteria may have a protective role while others have a harmful role (20). Further studies of the urinary microbiome and its relationship with BC development, progression, and recurrence are necessary (20). However, recent evidence suggests that we are in the presence of an ally that can be addressed as a target for earlier diagnosis, prevention, and treatment of BC (20).

Understanding how the human microbiome evolves with ageing and how ageing affects and changes the microbiome is important for future investigations involving the human microbiome (19). Repeated exposure to antibiotics in elderly people might lead to a greater dynamic change in the bladders microbiome when compared to younger people (19). Results suggested the existence of a core microbiome, which in the case of urine samples from the female gender was composed of elements from twenty-three genera, with each age group additionally having their distinct subset of genera (19). The discoveries made evident in this data suggest there will be considerable scientific interest in a larger study on the UM (19).

3.3 Microbiome and the individual's health status

L. Bossa *et al.*, considered that microbial community of patients can be an asset to monitor their health status (21). A study on three individuals with spinal cord injuries, often associated with neurogenic bladders, has shown that due to the use of long-term catheterization, the risk of microbial colonization and infection of the urinary tract (UTI) increases (21).

In their study, they found that some infection states (UTI) were accompanied by altered microbiomes (21). Additionally, they also reported some diversity in the urinary microbiome even among individuals with the same condition (21). Across the three patients, *Proteobacteria* was the dominant phylum (79% of the total bacterial community sequences) (21).

The *Firmicutes* was the second most abundant phylum (representation of 13%). Across all three patients, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* represented an average of less than 1%. Regarding the genus, the assignment was not clear. The most abundant families form the following: *Enterobacteriaceae* (48%, unclassified gender, OTU225), *Alcaligenaceae* (10%) and *Enterococcaceae*

Table 2: Comparison between health and disease of relevant bacteria genus presence in males and females by C. Gottschick, et al., 2017.

Ref.	Author	UT	NS	Healthy			Disease		Relevant Bacteria Present
				♀	♂	%	♀	♂	
(20)	C.Gottschick et al.	1	67	9	7	23,88%	51	76,12%	<i>Prevotella amnii</i> , <i>Sneathia amnii</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Atopobium vaginae</i>
		2	17	6	0	35,29%	11	64,71%	<i>Lactobacillus iners</i>
		3	26	9	2	42,31%	15	57,69%	<i>Shigella sonnei</i> , <i>Escherichia coli</i>
		4	8	3	2	62,50%	3	37,50%	<i>Enterococcus faecalis</i>
		5	5	1	1	40,00%	3	60,00%	<i>Streptococcus agalactiae</i>
		6	6	1	1	33,33%	4	66,67%	<i>Citrobacter murlinae</i>
		7	4	4	0	100,00%	0	0,00%	<i>Lactobacillus crispatus</i>
		8	55	10	18	50,91%	27	49,09%	Diverse
		9	-	-	-	-	-	-	-

Ref= References; UT=Urotype; NS=Number of Samples

(9%, OUT101) (21). The genera that could be identified were *Pseudomonas* (4%) and *Veillonella* (4%) (21). With a lower percentage, were identified sequences of the family *Enterobacteriaceae*/OTU224, genus *Haemophilus* and order *Bacteriodales*/OTU49 (each represented on average between 1 and 3% of the total community)(21).

The interactions between the microbiome and its host pathology are vital (23). Information suggests that the pathogenesis of the female lower urinary tract would have the same complex interaction between the host and the urinary microbiome (23). It should be noted that the urinary microbiome is a recent discovery and therefore these communications are yet to be understood (23). Data found demonstrates an interdependence between the specific urinary microbiome and host urinary host antimicrobial peptides (AMP) and has direct implications for urinary tract infection (23). The urine can directly influence the bladder microbiome, although we cannot distinguish between urothelial, immune cell, or bacterial-derived host antimicrobial peptides in the urine specimens (23). Further studies of the mechanisms by which bladder microbiota and host AMP communicate during homeostasis and pathologic states will be critical to our understanding of the pathogen-host interactions in the bladder and facilitate the development of better prevention in the future (23).

3.4. Urinary tract microbiome associated with bladder cancer

Recent studies suggest that the human microbiome can influence cancer development, however, the microbiome's role in bladder cancer has not yet been properly explored (5,11,22).

According to these studies, there was no significant difference in microbiome composition in terms of overall diversity or composition (5,11,22). The urinary microbiome of BC patients is mostly composed of phyla including *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Proteobacteria* (5,11,22) (Figure 2). The most frequently detected genera were *Streptococcus*, *Prevotella*, *Peptoniphilus*, *Campylobacter*, *Veillonella*, *Anaerococcus*, *Fingoldia*, and genera 1–68, belonging to the *Tissierellaceae* family (5,11,22). Results have shown a significant bacterial richness in BC patients when compared to non-cancer patients (5,11,22). These findings might suggest that the

urine microbiome can be used as a tool for diagnosing and prognosis of BC (5,11,22). Additionally, *Acinetobacter* and *Anaerococcus* were two of the most abundant genera of bacteria found in patients with bladder cancer (22). *Acinetobacter* is associated with nosocomial infections, including urinary tract infections (22). *Acinetobacter baumannii*, a species of *Acinetobacter* genus, is confirmed to be involved in biofilm formation, adherence and invasion of epithelial cells, bacterial dissemination by degrading phospholipids present at the mucosal barrier and escape from the host immune response (22). Anaerobic cocci, from the *Anaerococcus* species, was identified as responsible for inflammation, remodeling of extracellular matrix (ECM), and re-epithelialization (22). Patients with a high risk of recurrence showed an enrichment of *Herbaspirillum*, *Porphyrobacter*, and *Bacteroides* suggesting that these genera might be potential biomarkers on a recurrence and progression risk level (22). *Firmicutes* phyla represent approximately 33% making it the most abundant in samples from cancer patients (5,22) (Table 3).

Table 3: Phyla bacteria richness differences in Healthy Individuals and Bladder cancer Patients, by P. Wu *et al.*, 2018.

Phyla	Microbiome Healthy Individuals (mentioned as Control)	Microbiome Bladder Cancer
<i>Proteobacteria</i>	49.0%	39.7%
<i>Firmicutes</i>	28.1%	32.8%
<i>Actinobacteria</i>	6.2%	7.0%
<i>Bacteroidetes</i>	9.4%	3.9%

Genera bacteria abundance in bladder cancer patients:

Acinetobacter, *Anoxybacillus*, *Escherichia-Shigella*, *Geobacillus*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Gardnerella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* and *Aeromonas*.

3.5 Bladder's microbiome diagnostic value

It is well known that urine samples taken from patients with BC have greater bacterial abundance compared to urine from healthy patients (5).

B. Mansour *et al.* decided to compare the results obtained on urine specimens and cancer tissue from the same set of participants (5). The first ones were collected by transurethral resectoscopy and, the second ones, during cancer tissue removal by transurethral resection (5). According to previous studies, in which tissue samples were analyzed, these samples present the same composition concerning bacteria phyla as the urine microbiome (5). *Firmicutes* represented 34% abundance, with other phyla being found in these clinical trials, including *Proteobacteria* (29%), *Actinobacteria* (23%), *Cyanobacteria* (7%), and *Bacteroidetes* (4%) (11,22). The fact that these values are identical to the ones found on the urine microbiome, leads us to believe that a urine microbiome test is suitable as a diagnostic tool.

4. Discussion

From our results we can verify that there are differences between a healthy urinary microbiome and a BC urinary microbiome (18,19) (Figure 2 c)). D. Lewis *et al.*, E. Hilt *et al.*, A. Wolfe *et al.*, C. Gottschick *et al.*, B. Mansour *et al.*, P. Wu *et al.* and V. Nienhouse *et al.* clarified that the urinary microbiome was mainly composed of bacteria from genera *Lactobacillus* (2.63%), *Aeromonas* (0,02%), *Acinetobacter* (1,09%), *Staphylococcus* (10,12%), *Escherichia-Shigella* (24.46%), and *Streptococcus* (4.59%) (5,12,19,20,22,23). The same bacteria were described in BC urinary microbiome, by P. Wu, *et al.*, V. Popović, *et al.*, and B. Mansour, *et al.*, however, changes were not on a composition level but on a richness level where *Lactobacillus* (1.17%), *Aeromonas* (3.78%), *Acinetobacter* (3.25%), *Staphylococcus* (12.15%), *Escherichia-Shigella* (15.37%) and *Streptococcus* (9.28%) increased. (5,11,22). Moreover, the same results were found when comparing the results obtained from tissue samples with the results from urine samples, by B. Mansour *et al.* (Figure 3) (5,11,22).

Obtained results are still short and not too precise, however, we need to search for external factors that could cause changes to the urinary microbiome. Exposure for several years to tobacco smoke and other occupational or environmental exposures are known to be risk factors for the development of BC. We are probably dealing with risk factors capable of constantly changing the

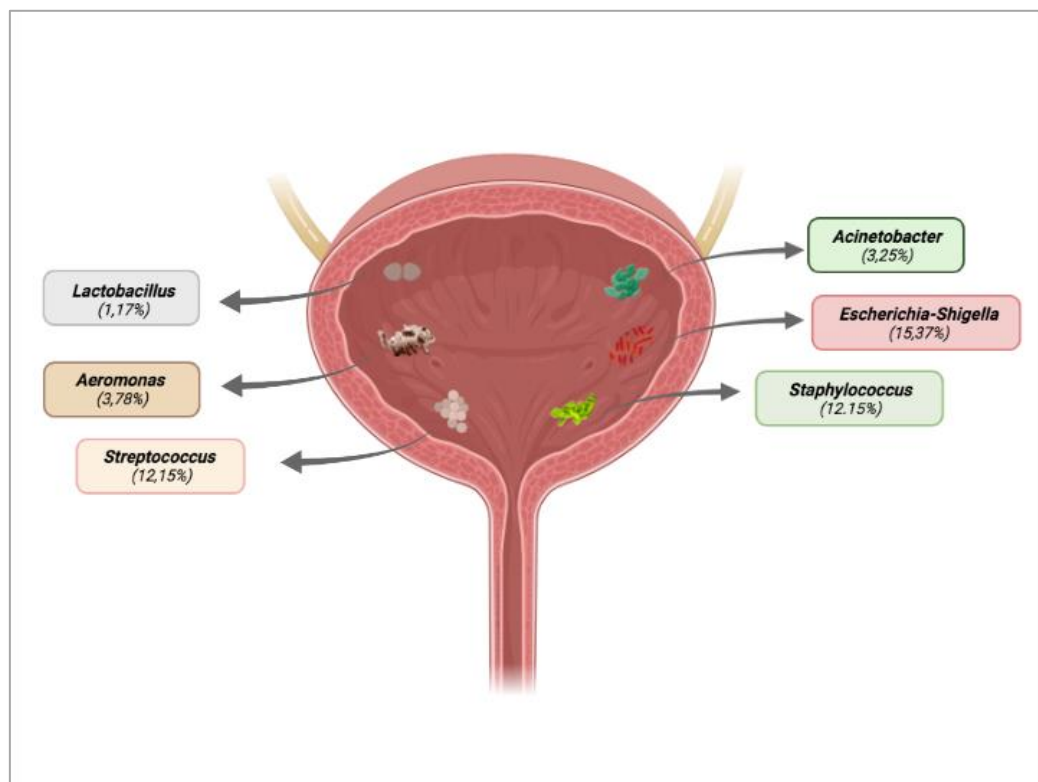


Figure 2. Urinary Microbiome most common bacteria composition, and respective richness in bladder cancer patients.

urinary microbiome - dysbiosis - generating successive inflammation states that are already described as a precursor of carcinogenesis. Alfano *et al.* have already described that specific pathogenic bacteria might promote the development of tumour-associated microenvironments capable of promoting the initiation and development of malignancies, such as the urothelial carcinomas (24). As supported by the results, certain microorganisms can have a protective role and others a harmful role (22). *Lactobacillus spp.* and *Escherichia-Shigella* show an abundance decrease of 1.45% and 9.09%, respectively in the control group compared to the cancer group (22). The decrease of these genera could mean that they have a protective role, and the exposure to the previously mentioned factors that influence the microbiome, could contribute to this decrease, and simultaneously may allow the growth and dissemination of harmful bacteria creating the perfect environment for the development of infected cells in the surface of the bladder, creating a BC starting point (22). *Staphylococcus spp.* is a bacterial group with a high level of increased richness in BC. These bacteria were present in all clinical trials, and it was verified that an increase in its abundance can be detected in earlier BC stages (11,18,23). This makes this bacterial genus highly related to the initial stage of carcinogenesis through the creation of an inflammatory environment (11,18,23). Considering the cellular level, the *Staphylococcus spp.* role should be better studied, however, it has been described for these bacteria the ability to produce various enzymes (alkaline protease, elastase, and phospholipase C) which could degrade ECM components, break down elastin, disrupt tight junctions, damage tissue, and cleave various bonds in phospholipids. The above analysis raises the possibility that microbiome-mediated modifications of ECM might play a role in the initiation and development of BC (25). *Aeromonas* and *Acinetobacter* were found to be the most abundant genera of bacteria found in patients with BC. Their presence was increased in cancer patients by 3.76% and 2.16%, respectively (18,19,22). *Herbaspirillum*, *Porphyrobacter*, and *Bacteroides* are not so mentioned but are associated with cases of high risk of recurrence (18,19,22). That said, we can be, in the presence of a set of bacterial genera that can

play a direct role in carcinogenesis and therefore, can become a potential biomarker for recurrence and progression (18,19,22).

The urinary microbiome can also suffer changes because of our daily routine, changes in our dietary or prescribed antibiotics could make the bladder more susceptible to dysbiosis (11,18,23). The results support the idea that some bacteria may have a protective role while others have a harmful role (11,18,23). Further studies of the urinary microbiome and its association with BC development, progression, and recurrence are necessary (11,18,23). However, recent evidence suggest that we facing an ally that can be addressed as a target for earlier diagnosis, prevention, and treatment of BC (11,18,23).

5. Conclusions

To summarize, there is no doubt that urine is not sterile, and this recent discovery allowed us to distinguish the urinary microbiome in healthy individuals and the urinary microbiome in individuals with BC. In both conditions, the main bacteria found were from the genera *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Escherichia-Shigella*, and *Streptococcus*. The main difference lies in the bacterial enrichment verified in cases of BC responsible for the development of a tumour-associated microenvironment associated with carcinogenesis. We are aware of some limitations of our study, namely, the reduced number of articles and, consequently, little representation of inter-individual variability, and differences related to gender, age, and health condition. In addition, it is a fact is that this issue is very recent, so there is still a lack of information and most of it still requires further clinical support. However, research in this area has shown that we may be facing a powerful ally, directly related to BC carcinogenesis, which can be manipulated to allow an earlier diagnosis and adjusted treatment options.

Author Contributions: Conceptualization, V.C., E.T., D.M. and F.M.; methodology, E.T. C.M., D.M. and F.M.; investigation, C.C., and D.M.; data curation, V.C., D.M. and F.M.; writing—original draft preparation, E.T.-d.-S., C.M.; writing—review and editing, E.T.-d.-S. D.M. and F.M.; supervision, E.T., D.M. and F.M.. All authors have read and agreed. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

Funding: This research was funded by the National Funds via Foundation for Science and Technology (FCT), Portugal through Strategic Projects UID/NEU/04539/2019, UIDB/04539/2020, and UIDP/04539/2020 (CIIBB).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

6. References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
3. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of Bladder Cancer. *Medical Sciences*. 2020 Mar;8(1):15.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
5. Mansour B, Monyók Á, Makra N, Gajdács M, Vadnay I, Ligeti B, et al. Bladder cancer-related microbiota: examining differences in urine and tissue samples. *Sci Rep*. 2020 Dec 6;10(1):11042.
6. Tavares-da-Silva E, Pereira E, Pires AS, Neves AR, Braz-Guilherme C, Marques IA, et al. Cold Atmospheric Plasma, a Novel Approach against Bladder Cancer, with Higher Sensitivity for the High-Grade Cell Line. *Biology (Basel)*. 2021 Jan;10(1):41.
7. Aragón IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuño MI, Castillo E, Del Moral JSG, Gómez-Millán J, et al. The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. Vol. 4, *European Urology Focus*. Elsevier B.V.; 2018. p. 128–38.
8. Kumar M, Ji B, Zengler K, Nielsen J. Modelling approaches for studying the microbiome. *Nat Microbiol*. 2019 Aug;4(8):1253–67.
9. Mager LF, Burkhard R, Pett N, Cooke NCA, Brown K, Ramay H, et al. Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science* (1979). 2020 Sep;369(6510):1481–9.

10. Aragón IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuño MI, Castillo E, Del Moral JSG, Gómez-Millán J, et al. The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. Vol. 4, *European Urology Focus*. Elsevier B.V.; 2018. p. 128–38.
11. Bučević Popović V, Šitum M, Chow CT, Chan LS, Roje B, Terzić J. The urinary microbiome associated with bladder cancer. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1):12157.
12. Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, Rong R, Kenton K, FitzGerald MP, et al. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*. 2012 Apr 1;50(4):1376–83.
13. Wu P, Zhang G, Zhao J, Chen J, Chen Y, Huang W, et al. Profiling the urinary microbiota in male patients with bladder cancer in China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 May;8(MAY).
14. Karstens L, Asquith M, Davin S, Stauffer P, Fair D, Gregory WT, et al. Does the Urinary Microbiome Play a Role in Urgency Urinary Incontinence and Its Severity? *Front Cell Infect Microbiol*. 2016 Jul 27;6(JUL).
15. Oresta B, Braga D, Lazzeri M, Frego N, Saita A, Faccani C, et al. The Microbiome of Catheter Collected Urine in Males with Bladder Cancer According to Disease Stage. *Journal of Urology*. 2021 Jan;205(1):86–93.
16. Markowski MC, Boorjian SA, Burton JP, Hahn NM, Ingersoll MA, Vareki SM, et al. The Microbiome and Genitourinary Cancer: A Collaborative Review. *Eur Urol*. 2019 Apr;75(4):637–46.
17. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Altman D, Antes G, et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009 Jul;6(7).
18. Hilt EE, McKinley K, Pearce MM, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, Mueller ER, et al. Urine Is Not Sterile: Use of Enhanced Urine Culture Techniques To Detect Resident Bacterial Flora in the Adult Female Bladder. *J Clin Microbiol*. 2014 Mar 1;52(3):871–6.
19. Lewis DA, Brown R, Williams J, White P, Jacobson SK, Marchesi JR, et al. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;4(AUG).
20. Gottschick C, Deng ZLL, Vital M, Masur C, Abels C, Pieper DH, et al. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. 2017 Dec 14;5(1):99.
21. Bossa L, Kline K, McDougald D, Lee BB, Rice SA. Urinary catheter-associated microbiota change in accordance with treatment and infection status. *Wilson BA*, editor. *PLoS One*. 2017 Jun 19;12(6):e0177633.
22. Wu P, Zhang G, Zhao J, Chen J, Chen Y, Huang W, et al. Profiling the urinary microbiota in male patients with bladder cancer in China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 May 31;8(MAY).
23. Nienhouse V, Gao X, Dong Q, Nelson DE, Toh E, McKinley K, et al. Interplay between Bladder Microbiota and Urinary Antimicrobial Peptides: Mechanisms for Human Urinary Tract Infection Risk and Symptom Severity. *Wooten RM*, editor. *PLoS One*. 2014 Dec 8;9(12):e114185.
24. Alfano M, Canducci F, Nebuloni M, Clementi M, Montorsi F, Salonia A. The interplay of extracellular matrix and microbiome in urothelial bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2016 Feb;13(2):77–90.
25. Wu P, Zhang G, Zhao J, Chen J, Chen Y, Huang W, et al. Profiling the urinary microbiota in male patients with bladder cancer in China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 May;8(MAY).

Research Article

THE MOST FREQUENT PLACENTAL PATHOLOGY IN FETAL DEATHS

Eduarda Fragoso ^{1*}, Catarina Cerdeira ², Rui Caetano Oliveira ², Cláudia Córdova ¹ and Raquel Pina ²

- 1 Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco (ESALD-IPCB); claudiamarcos@ipcb.pt
 - 2 Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), Serviço de Anatomia Patológica; catarina-cerdeira@hotmail.com
- * Correspondence: eduardafragoso2000@gmail.com;

Abstract: Fetal death is a traumatic event for women and a public health problem. Therefore, fetal autopsy and anatomopathological examination of the placenta are the most practical tests that allow understanding and characterizing the etiology of fetal death. This study aimed to identify the most frequent placental pathology in fetal deaths observed at the "Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra" and was established as a specific objective identifying the infectious agent causing acute inflammatory pathologies in fetal deaths. A quantitative study was used to identify the most frequent placental pathology in fetal deaths in cases occurring between 2015 and 2018, and 203 cases were studied. After analyzing the database, it was observed that fetal deaths occurred predominantly in the 16th week of pregnancy and that the peak maternal age was 36 years old. Of all the fetal deaths, we conclude that inflammatory pathology was the most frequent placental cause, with chorioamnionitis prevailing. More studies must be conducted to detect the infectious agent that led to fetal death.

Keywords: Fetal Death; Placenta; Pathology; Chorioamnionitis; Ureaplasma;

1. Introduction

Fetal death, a public health problem, is a traumatic event for women. The most practical tests to understand fetal death's etiology are fetal autopsy and anatomopathological examination of the placenta. The application of research protocols is vital for the grieving process, evaluating the risk of recurrence, and planning prevention strategies for a future pregnancy.

According to data from Eurostat, the Statistical Office of the European Union, the late fetal mortality rate in the European Union in 2017 was 4.5% and in Portugal in 2018 was 3.7%. The perinatal mortality rate, meanwhile, in the European Union, in 2017 was 6.2%, while in Portugal, in 2018, it was 5.3%. Between 2011 and 2018, the perinatal mortality rate in Portugal didn't change much, as did the late fetal mortality rate (1).

Fetal deaths

Gestational Age (GA), corresponding to the period of pregnancy, is counted from the first day of the last menstrual period until the expulsion of the product of conception. During this process, there are two biological periods: the embryonic period, which runs from fertilization until the end of the 10th week of GA, and the fetal period, which occurs from the 11th week of GA until the end of pregnancy (+38 weeks of GA).

Fetal death (FD) is an intrauterine death after 11 weeks GA divided into early fetal death - up to 22 weeks - and late fetal death - from 22 weeks onward. It is a complex situation in which many factors may contribute to its pathogenesis, making etiological diagnosis difficult (2). Furthermore, the frequency with which the various factors are described in the literature is very variable due to the differences between the populations studied, the gestational age at which it occurs, and the type of investigation performed. Classically, they are grouped into maternal, fetal, and placental conditions directly related to the fetus, the mother, the placenta, or the delivery (3,4).

There may be several maternal causes, such as diabetes, taking medication during pregnancy, and cervical incompetence in labor. Fetal causes, such as congenital malformations and chromosomal/genetic abnormalities (for example, Trisomy 21), are the most prevalent. Lastly,

Citation: Fragoso, E.; Cerdeira, C.; Córdova, C.; Oliveira, R.; Pina, R. The most frequent placental pathology in fetal deaths. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2023 Mar 11;1(1):18-28.

Academic Editor: Diana Martins

Received: 27 January 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 11 March 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences.

placental causes are disregarded, such as inflammatory pathology, pregnancy hypertensive pathology, and umbilical cord injuries (4).

Anatomopathological examination of the placenta

The fetuses and their placentas are analyzed at the time of fetal death. The anatomopathological study (macroscopic and microscopic) of the placenta is the key to obtaining reliable information about the intrauterine environment and determining the cause of most placental pathologies that can lead to fetal death (5).

The purpose of studying the placenta is to discover if it helps clarify the cause of fetal death. Therefore, several procedures are necessary to examine the placenta, from the identification of the placenta, it is washing, the photographic record (maternal and fetal face), its measurement, and all its attachments and fixation. After this last step, the macroscopic examination begins, consisting of several phases, with the primary objective being to collect samples that provide "a posteriori" information about fetal death (6,7).

Placental Pathology

Pathological changes in the placenta can modify the course of normal gestation and may determine the death of the fetus. According to Heerema-McKenney, Popek, and Da Paepe (2018), 12 placental pathologies have been highlighted: inflammatory pathology (acute and chronic), massive perivillous fibrin deposition, fetal vascular malperfusion, hypervascular lesions, placental mesenchymal dysplasia, maternal vascular malperfusion, umbilical cord injury, trophoblast disease, maternal-fetal hemorrhage/hematoma, abnormal implantation of the placenta, altered villous development, small uninjured placenta, and large uninjured placenta (8).

Inflammatory pathology

Inflammatory pathology is inflammation that occurs in vascularized tissues and is a local reaction of the body's tissues to internal or external aggression. Inflammation acts as if it were a defense mechanism and sometimes ends up becoming something derogatory to the individual. The leading causes of inflammation are microorganisms, immune reactions, physical agents, chemical agents, foreign bodies, and tissue repair. Inflammation can be classified as acute or chronic, and in acute inflammation, there is the exudation of liquid, proteins, and accumulation of leukocytes - mostly neutrophils - while in chronic inflammation, there is the persistence of the inflammatory agent, there is prolonged exposure to the toxic agent, and pathology may develop. In addition, there is an increase in lymphocytes and macrophages, vascular proliferation, and fibrosis (9).

According to the literature, inflammatory placental pathology is the primary cause of all fetal deaths because the amniotic fluid has to be sterile for the proper development of the fetus. There are two routes of infection in pregnancy: the ascending route (through contamination of the amniotic fluid) and the hematogenous route (transmitted through the blood) (10).

In acute inflammatory pathology, there is infiltration of the amnion, primarily by neutrophils, followed by eosinophils (8,11). It can be expressed as acute chorioamnionitis, acute villitis, umbilical vasculitis, funisitis, and chorionic vasculitis. Acute chorioamnionitis is the most common infection of the placenta and consists of inflammation in the free membranes, the chorionic plate, the subchorionic space, the vessels in the chorionic plate or umbilical cord, and Wharton's jelly (12,13,14). However, it is more common to find this pathology at the site of ruptured membranes and in the subchorionic space. Its development is due to ascending infection because of abnormal vaginal flora, premature cervical dilatation, and premature rupture of the membranes (15). The inflammatory cells found - mostly polymorphonuclear (PMN) - are of maternal origin (8,16,17).

In contrast, the PMN in the umbilical cord and the chorionic plate vessels are of fetal origin. Therefore, when a sign of inflammation is found in the fetal vessels, the fetus has an immune response. With the release of cytokines, this response causes lesions in the blood vessels in the placenta and, consequently, in the fetal vessels that can lead to brain lesions (8).

According to Heerema-McKenney, Popek, and Da Paepe (2018), the most common infectious agents that cause this pathology by ascending entry through the lower genital tract are *Streptococcus B*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, and *Klebsiella spp.* Furthermore, according to Schrag Sk et al. (2016) and Stoll Bj et al. (2020), *Streptococcus B* and *Escherichia coli* are also the infectious agents most responsible for acute inflammatory pathology (18,19). In addition, anaerobic microorganisms cause this pathology: *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium*, and some fastidious - *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* (8,20,21,22).

Acute villitis, unlike acute chorioamnionitis, isn't an ascending infection transmitted via the maternal-fetal route. The mother transmits the disease to the fetus through the blood circulation between the two. In the amniotic fluid, the infection is present, and therefore the umbilical cord is also exposed to this infection. Thus, there is a response from the neutrophils, which starts in the umbilical vein and then moves on to the two arteries of the cord, called umbilical vasculitis. This infection extends into Wharton's jelly, called funisitis (8,12,23,24). Acute chorioamnionitis and acute villitis coincide with chronic inflammatory injury (8).

With the progression of this infection, which becomes more severe as it spreads to different structures, chorionic vasculitis also occurs. In this, there is a neutrophilic response in the blood vessels of the chorionic plaque. It should be noted that chorionic vasculitis doesn't spread beyond the vessels of the chorionic plaque. However, if acute villitis is present, such spread may occur due to fetal sepsis (12,24).

On the other hand, in chronic inflammatory pathology, there is infiltration of lymphocytes, histiocytes, plasma cells, and eosinophils in the different structures that make up the placenta (25). According to Heerema, Popek, and Paepe (2018), chronic pathology stems from an alloimmune reaction of the mother that increases levels of inflammation. Chronic inflammation is related to premature rupture of membranes (PRM), intrauterine growth restriction (IUGR), increased risk of neurological abnormalities, and fetal death. It can also lead to repeat abortions and preeclampsia (PE). Currently, there is no specific treatment for chronic inflammatory pathology, and even if the etiology of the infection is known, sometimes there is no treatment (8,10).

Chronic inflammatory pathology can occur in the villi, membranes, chorionic plate, fetal vessels, decidua, and intervillous space. It can also be secondary to an infection. The most common agents are Syphilis, Parvovirus, Herpes simplex, Toxoplasmosis, and Cytomegalovirus. Thus, the lesions that can be found are chronic deciduitis, chronic villitis, chronic histiocytic intervillitis, chronic chorioamnionitis, chronic histiocytic hyperplasia, and chorionic T cell/eosinophilic vasculitis (CTEV) (8,26).

The increase in lymphocytes or plasma cells in the decidua is called chronic deciduitis. Deciduitis can be divided into two degrees: extent (focal, multifocal, or diffuse) and severity (mild, moderate, or severe), according to Heerema, Popek, and Paepe (2018). The presence of plasma cells in the decidua makes a difference, as it immediately diagnoses chronic deciduitis. This pathology is related to infections, such as Toxoplasmosis, Rubella, or Cytomegalovirus, a problem in the mother's immune system, or pelvic infection. It is typical for chronic villitis and chronic deciduitis to coincide in preterm births (8,27).

Chronic basal villitis represents a chronic inflammation expressed only in the villi of the maternal plaque (8,16). Most chronic villitis (close to 95%) is of unknown etiology. However, they occur because of the mother's immune reaction against the antigens of the placental villi, thus leading to an inflammatory process. This pathology is most common in the third trimester of pregnancy and is associated with IUGR, prematurity, and fetal death and is likely to recur in future pregnancies (8,28).

Chronic histiocytic intervillitis is rare. It's an infiltration of histiocytes in the intervillous space and is related to high fibrin deposition. Again, this is an autoimmune response from the mother. This pathology rarely coincides with chronic villitis (8,12,29,30).

In chronic chorioamnionitis, there is infiltration into the extraplacental membranes, chorionic plaque, and/or umbilical cord of maternal lymphocytes, macrophages and histiocytes, fetal histiocytes, eosinophils and plasma cells (8,10,12,31). The lymphocytic infiltrate is centered in the extravillous trophoblast. It may be ascending infection, the most common infectious agents being Herpes Simplex, Cytomegalovirus, and Syphilis. Chronic chorioamnionitis appears together with chronic villitis in the placenta (8).

Finally, chorionic T cell/eosinophilic vasculitis (CTEV) is an inflammation of the chorionic plaque vessels with a mixture of T cells and eosinophilic cells of fetal origin. It's a rare condition, but if it does occur, it is common to be in the third trimester of pregnancy, starting at 35 weeks. It has not yet been associated with infection or maternal or fetal conditions (8,32).

This study aimed to identify the most frequent placental pathology in fetal deaths observed at the Coimbra Hospital and University Center (CHUC).

Identifying the infectious agent causing acute inflammatory pathologies in fetal deaths was established as a specific objective.

2. Materials and Methods

The Ethics Committee approved this study of the CHUC and the Ethics Committee of the Polytechnic Institute of Castelo Branco. A quantitative study was conducted on 203 samples of fetal deaths that occurred between 2015 and 2018, excluding all cases resulting from early abortions (up to 11 weeks), Medical Termination of Pregnancy (MTP), twin pregnancies, and autopsies of newborns and infants. Data collection was performed using the CHUC software. In addition to clinical data on pregnancy and GA, cultures of urine, vaginal exudate, rectal exudate, amniotic fluid, and placenta were also consulted at the time of birth in the clinical pathology platform.

Several variables were taken into account to build the database (Appendix 1), and four new variables were created to identify the infectious agent of acute inflammatory pathology in fetal deaths (Appendix 2).

Subsequently, the data obtained were analyzed.

3. Results

From a total of 666 fetal autopsies, newborn autopsies, and infant autopsies between 2015 and 2018, 203 (30%) cases of fetal deaths performed at the CHUC were analyzed, and 463 (70%) cases were excluded (Figure 1). Of the 203 cases analyzed, 87 (43%) were from Dr. Bissaya Barreto's Maternity and 116 (57%) from Dr. Daniel de Matos's Maternity.



Figure 1. Total number of fetal deaths between 2015 and 2018 performed at the CHUC and all fetal specimens used, in that same time interval, for the study, in percentage. The light pink area of the graph refers to the total number of rejected autopsies and the bordeaux area of the graph to the total number of fetal deaths that entered the study.

In figure 2, we can see that fetal death occurred in all gestational ages (eleventh week of gestation - minimum GA - until the forty-first week - maximum GA), where: at the 16th and 22nd week, 8% of total fetal deaths were obtained; at the 13th, 17th, 19th, 23rd, and 24th week, 6% were obtained; at the 15th week 5% were obtained; at the 20th and 21st week 4% were obtained; at the 12th, 18th, 37th, and 38th week 3% were obtained; The 11th, 14th, 28th, 29th, 31st, 32nd, 34th, 35th, and 40th weeks had 2%, the 25th, 27th, 30th, 33rd, 36th, and 39th weeks 1%, and finally the 26th and 41st weeks had 0.5% of fetal deaths.

The mode of gestational age where there were more cases of fetal deaths was in the sixteenth week, making up 8% of the 203 cases in the study, while the average GI was 22.62.

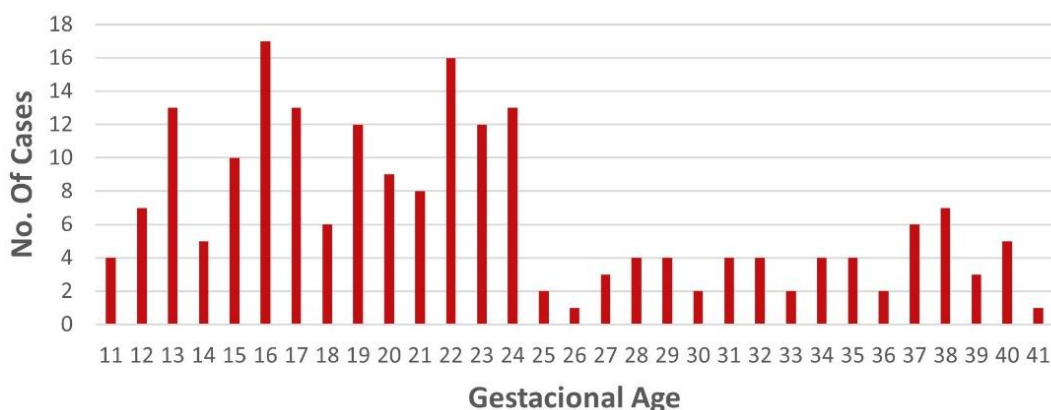


Figure 2. Number of cases of fetal deaths considering gestational age.

According to the division of gestational age in the study, from the 11th week to the 22nd week, 119 cases (59%) of fetal deaths were observed, 36 cases (18%) between the 22nd week and the 28th week were considered intermediate late fetal deaths, and 48 cases (24%) were late fetal deaths, i.e., over 28 weeks.

In fetal deaths by trimester division (figure 6), 127 cases (63%) were observed in the second trimester of pregnancy (14th week to 27th week), 52 cases (26%) in the third trimester (28th week to 41st week), and 24 cases (12%) in the first trimester (11th week to 13th week).

In the presence or absence of maceration, we observed: 77 cases (38%) with absent maceration, 35 cases (17%) with maceration of 5 days or more, 33 cases (16%) with 2-day maceration, 25 cases (12%) with 1-day maceration, 19 cases (9%) with 3-day maceration, 11 cases (5%) with 4-day maceration, and 3 cases (1%) with undetermined maceration. The mean maceration was 1.84, and the mode was 0.

Of the 203 cases included in the study, 111 cases (55%) were male, 86 cases (42%) were female, and 6 cases (3%) where no such distinction could be made.

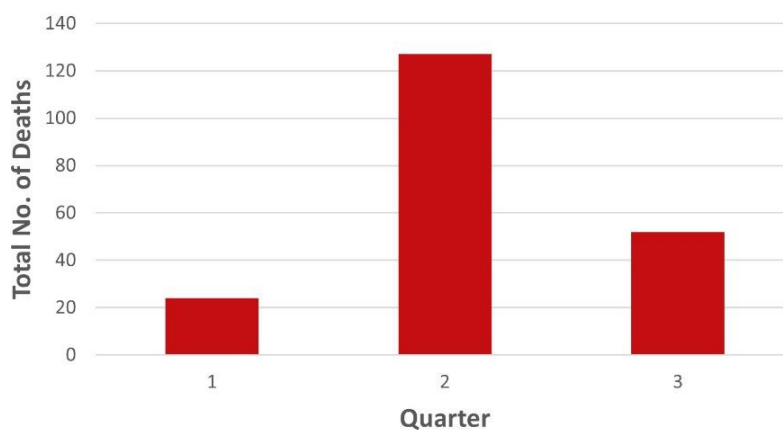


Figure 3. Number of cases of fetal deaths by quarterly division. First Trimester - 1st week to 13th week; Second Trimester - 14th week to 27th week; Third Trimester - 28th week to 41st week.

The mean maternal age at the time of fetal death (Figure 4) was 32.85 years, with a minimum maternal age of 19 years and a maximum of 47 years, and no mother was 46 years old. Of these, there were 10% of cases with undetermined age, 8% with 36 years, 6% with 27, 33, 39, and 40 years, 5% with 37 years, 4% with 29, 30, 34, and 35 years, 3% with 22, 26, 28, 31, 32, 38 years, 2% with 23, 41, 42 years, 1% with 19, 20, 21, 24, 43 and 44 years, 1% with 25, 45 and 47 years.

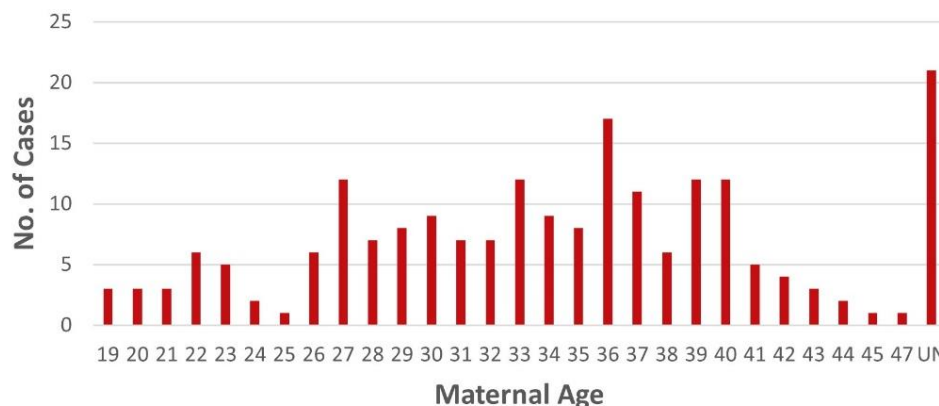


Figure 4. Number of fetal deaths cases taking maternal age into account.

The cause of fetal death (Figure 5) in 141 of the cases (69%) was the placental cause, 43 of the cases (21%) was the fetal cause, 9 of the cases (4%) the cause was undetermined, 7 of the cases (3%) the cause was placental and fetal, and 3 of the cases (1%) the cause was due to other problems.

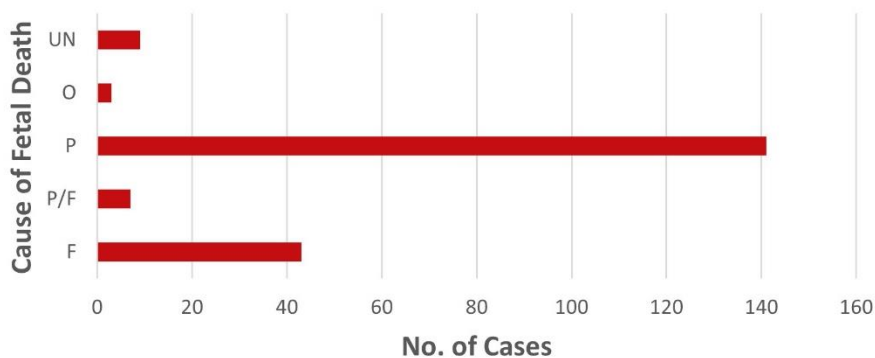


Figure 5. Number of cases distributed according to placental and/or fetal cause, other or undetermined. UN - Undetermined cause; O - Cause due to other problems; P - Placental cause; P/F - Placental and fetal cause; F - Fetal cause.

In the distribution of placental pathologies (Figure 6), the most predominant pathology was inflammatory pathology in 23% (53 cases) of the total cases. The remaining cases presented another etiology: 14% (33 cases) from fetal vascular malperfusion, 13% (29 cases) from maternal vascular malperfusion lesions, 9% (21 cases) from umbilical cord lesions, 5% (12 cases) from maternal-fetal hemorrhage/hematoma, 4% (10 cases) in which the pathology was undetermined, 3% (6 cases) from villous developmental changes and hypervascular lesions, 2% (5 cases) of massive fibrin deposition and small placenta without other lesions, 1% of abnormal placental implantation (3 cases) and large placenta without other lesions (2 cases), and 0% (0 cases) of placental mesenchymal dysplasia and trophoblast disease. In 45 cases (20%), this distribution was not applied because the cause was fetal and other origins and didn't enter this distribution.

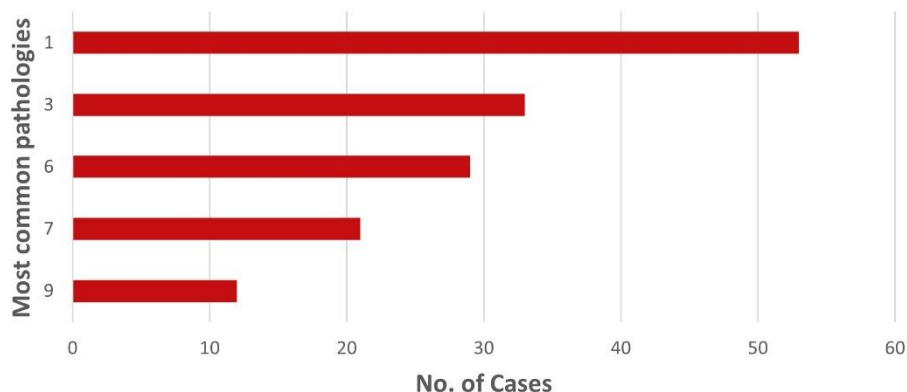


Figure 6. Distribution of the five most common Placental Pathologies. 1 - Inflammatory Pathology; 3 - Fetal Vascular Malperfusion; 6 - Maternal Vascular Malperfusion; 7 - Umbilical Cord Injury; 9 - Maternal Fetal Hemorrhage/Hematoma.

Among the various pathologies, the pathology was isolated in 121 cases (60%). In 24 cases (12%), two pathologies were related. It was undetermined in 11 cases (5%); in 3 cases (1%), there were two pathologies but no relationship between them. In 44 cases (22%), this criterion was not applied since the cause was: fetal origin, due to other causes, or indetermination due to lack of information.

We can observe in figure 7 that of the fetal deaths with placental cause, 26% of the cases presented inflammatory pathology. In 43 cases (21%), this was acute inflammatory pathology. In 10 cases (5%) were related to chronic inflammatory Pathology: 8 cases (4%) had chronic inflammatory pathology of unknown etiology, and 2 cases (1%) had chronic inflammatory pathology of an infectious etiology. Finally, we obtained 150 cases (74%) where inflammatory pathology was not applied.

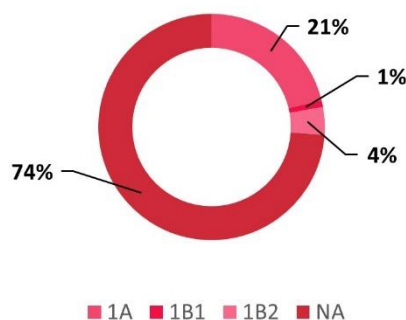


Figure 7. Distribution of cases by inflammatory pathology, in percentage. 1A - Acute Inflammatory Pathology; 1B1 - Chronic Inflammatory Pathology of Infectious Etiology; 1B2 - Chronic Inflammatory Pathology of Unknown Etiology; NA - Cases where this Inflammatory Pathology was not applied.

Of the 43 fetal deaths caused by acute inflammatory pathology (Figure 8), 7 cases (15%) had negative amniotic fluid culture results. In 3 cases (7%), the infectious agent was *Ureaplasma spp.* In two cases (4%), it was *Escherichia coli*, and in another 2 cases (4%), it was *Streptococcus agalactiae*. There was also one case (2%) of *Morganella morgani*, β -hemolytic *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Prevotella melaninogenica*, and *Peptococcus anaerobius*. In 3 cases, two infectious agents were detected, so the total distribution of infectious agents was 46. In 26 cases (57%), it was not possible to identify the infectious agent because the amniotic fluid was not cultured.

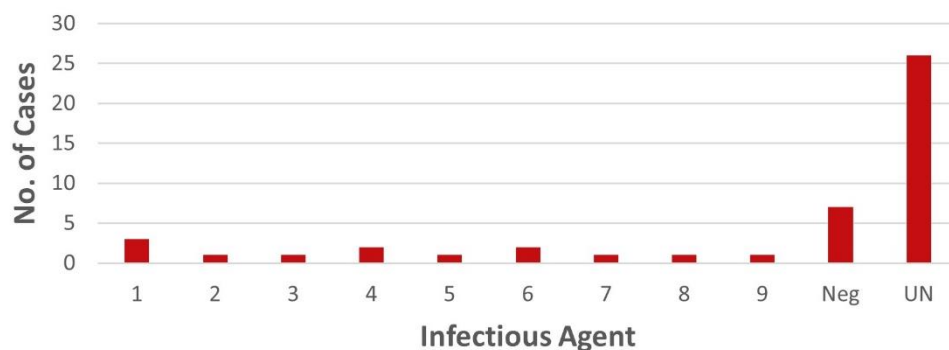


Figure 8. Distribution by infectious agents detected. 1 - *Ureaplasma spp*; 2- *Morganella morgani*; 3- β -hemolytic *Streptococcus*; 4 - *Escherichia coli*; 5 - *Staphylococcus aureus*; 6 - *Streptococcus agalactiae*; 7 - *Candida albicans*; 8 - *Prevotella melaninogenica*; 9 - *Peptococcus anaerobius*; Negative Culture; IN - Undetermined Infectious Agent.

In fetal deaths due to chronic inflammatory pathology of infectious etiology, 2 cases were detected, the infectious agents being Parvovirus and Syphilis.

Within the hypervascular lesions, there were only 7 cases, in which 0 cases (0%) of Corangioma, 3 cases (1%) of Corangiosis, and 4 cases (2%) of Corangiomas were obtained. In the remaining 196 cases, this division was not applied.

4. Discussion

The death of a fetus in utero is a traumatic event for women - a public health problem. This investigation aimed to identify the most frequent placental pathology in fetal deaths.

From a total of 666 fetal, newborn and latent autopsies, 203 cases were studied, and the rest were excluded because they resulted from early abortions (up to 11 weeks), IMG, twin pregnancy cases, or newborn and latent autopsies.

From the analysis of this study, it was possible to observe that it was in the 16th week of pregnancy that more fetal deaths occurred, thus falling into the category of early fetal deaths.

It was also found that the second-highest peak of fetal deaths occurred at 28 weeks, corresponding to the third trimester of pregnancy.

According to a study conducted in the Department of Pathology in Aurangabad (2021), with a total of 33 cases of fetal deaths, they concluded that most of these deaths occurred between the 15th week and the 19th week of gestational age, the data being in agreement with the present study (33). Furthermore, Monasta L., Giancreco M., Ancona E, et al. (2020) observed that in 278 cases of fetal deaths with a gestational age over 23 weeks, 72% of these deaths occurred at a gestational age over 30 weeks, corresponding to the third trimester of pregnancy, and these data are in agreement with the results of this investigation (34).

Of the sample of fetal deaths studied, the majority had no maceration and were male. These results are consistent with studies by Muin DA, Haslach H, Koller V, et al. (2018), where they found no relationship between the level of maceration and the maternal pathology under study. In the sample of 91 cases of fetal deaths, 48 were male fetuses, and 43 were female fetuses (35).

In another study, "Maceration determines the diagnostic yield of fetal and neonatal whole body post-mortem ultrasound" (2020), 265 post-mortem ultrasounds were performed: 152 cases were male fetuses, 111 were female fetuses, and two were undetermined. Of the 265 cases: 107 had no maceration, 55 had mild maceration, 32 had moderate maceration, and 71 had extensive maceration, and this study agrees with the results observed in this paper (36).

According to PORDATA, the average age of the mother at the birth of the first child in 2015 was 30.2 years. However, there has always been an increase over the years, and in 2020 the average age recorded was 30.7 years (37). Thus, it can be seen that over the past few years, pregnancy has been somewhat weighted towards a later age, and it is expected that there will be more problems during pregnancy because of advancing age.

According to the literature, in the "Risk factors of intrauterine fetal death: a case-control study at the maternity of Yaounde Central Hospital" (2019), the risk factors that stood out the most in IUGR were: maternal age over 30 years, hypertension, and multiparity (38), and these factors can lead to fetal death, thus agreeing with this research. Analyzing the maternal age obtained, we found that the peak of fetal deaths was 36 years of maternal age.

More than half of the cases studied were justified by a placental cause (141 cases) and 43 cases of fetal origin.

Inflammatory pathology was the most prevalent, with acute chorioamnionitis being the most present (43 cases). According to Algerian, K. (2020), there is a relationship between a clinical and histological diagnosis of chorioamnionitis. In a sample of 255 cases, he identified 135 cases with evidence of chorioamnionitis and 120 cases showing no sign of chorioamnionitis (39).

The pathologies followed were fetal vascular malperfusion, maternal vascular malperfusion/hypoxic-ischemic injuries, and umbilical cord injuries. In this study, these four pathologies appeared in association, two by two, with placental causes. However, finding only one placental pathology responsible for fetal death is more frequent than two associated pathologies. There were 11 cases where fetal vascular malperfusion appeared simultaneously with umbilical cord lesions. These two pathologies may be related to thrombi in the cord vessels, leading to stenosis and disruption of vascular function, causing fetal death. According to Redline RW and Ravishankar S. (2018), there is a correlation between MVF and umbilical cord thrombosis, and this cause is one of the significant risks of fetal death (40).

The microbiological analysis of the infectious agent responsible for chorioamnionitis, according to "Diagnostic Pathology Placenta" (2018), is the β -hemolytic *Streptococcus* and Gram-negative organisms - where are included *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* - the most observed (6). However, in this study, the results were not in agreement with those of the mentioned literature, as only 3 cases of *Ureaplasma spp* were observed, only 2 cases of *Escherichia coli*, and no cases of β -hemolytic *Streptococcus*.

Another publication, "Perinatal Infection With *Ureaplasma*" (2021), where data from several investigations were pooled, showed an association between *Ureaplasma spp.* and chorioamnionitis in 68.4% of cases, with only 26.7% having another infectious agent. These observed results are in agreement with the present study (41).

One of the limitations of this research was that there was not enough data to answer the specific objective, namely the search for the infectious agent causing this pathology. Possibly, it is because the microbiological study of the placenta only started to be performed in 2018. However, the results of microbiological agents from cultures performed on the pregnant woman near delivery (urine, vaginal and rectal exudates) were searched.

5. Conclusions

In summary, we can conclude that the most frequent placental pathology in fetal deaths between 2015 and 2018 at CHUC was inflammatory pathology. However, we also found a great diversity of microbial agents with no prevalence. This result is probably related to the small number of cultures performed, but it may also mean a change in microbial agents since screening for the most common agent previously, β -hemolytic *Streptococcus*. Further studies are therefore needed to acquire information to minimize the number of fetal deaths.

Supplementary Materials: Appendix 1 and 2.

Author Contributions: Both authors contributed equally to this work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

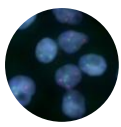
Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

6. References

1. Eurostat - Data Explorer [Internet]. [cited 2022 Jan 24]. Available from: <https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do>
2. Enid Gilbert-Barness A, Debich, Diane-Spicer B. *Embryo & Fetal Pathology*. Cambridge University Press; 2004.
3. Akison LK, Nitert MD, Clifton VL, Moritz KM, Simmons DG. Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. Vol. 54, *Placenta*. W.B. Saunders Ltd; 2017. p. 52–8.
4. Silver RM. Fetal death. *Obstet Gynecol*. 2007 Jan;109(1):153–67.
5. Nakayama M. Significance of pathological examination of the placenta, had with a focus on intrauterine infection and fetal growth restriction. *J Obstet Gynaecol Res* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Oct 12];43(10):1522–35.
6. Kaplan CG. *Color Atlas of Gross Placental Pathology*. Second Edi. Springer; 2007.
7. Centro Hospitalar São João - Serviço de Anatomia Patológica. *Manual de Macroscopia*. 2012.
8. Amy Heerema-McKenney M, Edwina J. Popek D, Monique E. De Paepe, MD Ms. *Diagnostic Pathology Placenta*. Second. Elsevier USA; 2019.
9. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Patologia Básica*. Elsevier Ltd; 2013.
10. Enid Gilbert-Barness A, MD, MBBS, FRCPA, FRCPath, DSci(hc) M. Potter's *Pathology of the Fetus, Infant and Child*. Second Edi. Raj P. Kapur, MD PD, Luc L. Oligny, MSc M, Joseph R. Siebert PD, editors. Elsevier Inc.; 2007.
11. Kim CJ, Romero R, Chaemsaithong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM. Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Oct 1;213(4):S29–52.
12. Faye-Petersen OM, Heller DS, Joshi V V. *Handbook of Placental Pathology*. Second Edi. Taylor & Francis; 2006.
13. van der Krogt L, Ridout AE, Seed PT, Shennan AH. Placental inflammation and its relationship to cervicovaginal fetal fibronectin in preterm birth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017 Jul 1;214:173–7.
14. Lee JH, Kim CJ, Kim JS, Lee DC, Ahn S, Yoon BH. Increased miR-223 expression in foetal organs is a signature of acute chorioamnionitis with systemic consequences. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 Oct 12];22(2):1179–89.
15. Jean W. Keeling, Khong TY. *Fetal and Neonatal Pathology*. Fourth Edi. Springer; 2007.
16. Nakayama M. Significance of pathological examination of the placenta, with a focus on intrauterine infection and fetal growth restriction. *J Obstet Gynaecol Res* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Feb 7];43(10):1522–35.
17. de Moreuil C, Hannigsberg J, Chauvet J, Remoue A, Tremouilhac C, Merviel P, et al. Factors associated with poor fetal outcome in placental abruption. *Pregnancy Hypertens*. 2021 Mar 1;23:59–65.
18. Schrag SJ, Farley MM, Petit S, Reingold A, Weston EJ, Pondo T, et al. Epidemiology of Invasive Early-Onset Neonatal Sepsis, 2005 to 2014. *Pediatrics* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 May 7];138(6).
19. Stoll BJ, Puopolo KM, Hansen NI, Sánchez PJ, Bell EF, Carlo WA, et al. Early-Onset Neonatal Sepsis 2015 to 2017, the Rise of *Escherichia coli*, and the Need for Novel Prevention Strategies. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 May 7];174(7).
20. Paralanov V, Lu J, Duffy LB, Crabb DM, Shrivastava S, Methé BA, et al. Comparative genome analysis of 19 *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* strains. *BMC Microbiol* [Internet]. 2012 May 30 [cited 2022 Oct 12];12(1):1–20.
21. Matasariu DR, Ursache A, Agache A, Mandici CE, Boiculese VL, Bujor IE, et al. Genital infection with *Ureaplasma urealyticum* and its effect on pregnancy. *Exp Ther Med* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Oct 12];23(1):NA-NA.
22. Norwitz ER, Saade GR, Miller H, Davidson CM. Chorioamnionitis (Intraamniotic Infection)1. *Obstet Clin Algorithms* [Internet]. 2016 Oct 21 [cited 2022 Oct 12];84–5.
23. Larru B, Zaoutis TE. *Infection and Immunity. Fetal and Neonatal Secrets* [Internet]. 2014 [cited 2022 Oct 12];316–68. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323091398000134>
24. *Intra-Amniotic Infection/Inflammation and the Fetal Inflammatory Response Syndrome - ClinicalKey* [Internet]. [cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323712842000124>
25. Raman K, Wang H, Troncone MJ, Khan WI, Pare G, Terry J. Overlap Chronic Placental Inflammation Is Associated with a Unique Gene Expression Pattern. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jul 24 [cited 2022 Oct 12];10(7):e0133738. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0133738>
26. Cornish EF, McDonnell T, Williams DJ. Chronic Inflammatory Placental Disorders Associated With Recurrent Adverse Pregnancy Outcome. *Front Immunol*. 2022 Apr 22;13:1837.
27. Morimune A, Kimura F, Moritani S, Tsuji S, Katusra D, Hoshiyama T, et al. The association between chronic deciduitis and preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2022 Mar 1;150:103474.
28. de Koning L, Crawford S, Nohr E, Chadha R, Horn C, Wright JR, et al. Recurrence risk of villitis of unknown etiology: Analysis of a large retrospective cohort study, systematic review and meta-analysis. *Placenta*. 2022 Mar 24;120:32–9.

29. Hussein K, Stucki-Koch A, Müller AM, Arnold R, Kreipe H, Feist H. Complement receptor-associated CD163+/CD18+/CD11c+/CD206-/CD209- expression profile in chronic histiocytic intervillitis of the placenta. *Placenta*. 2019 Mar 1;78:23–8.
30. Koby L, Keating S, Malinowski AK, D'Souza R. Chronic histiocytic intervillitis – Clinical, biochemical and radiological findings: An observational study. *Placenta*. 2018 Apr 1;64:1–6.
31. Lee J, Kim JS, Park JW, Park CW, Park JS, Jun JK, et al. Chronic chorioamnionitis is the most common placental lesion in late preterm birth. *Placenta*. 2013 Aug 1;34(8):681–9.
32. Cheek B, Heinrich S, Ward K, Craver R. Eosinophilic/T-cell chorionic vasculitis: Histological and clinical correlations. *Fetal Pediatr Pathol*. 2015 Apr 1;34(2):73–9.
33. Bhale CP, Vare A, Gupta A. Fetal Autopsy-Categories and Causes of Death at a Tertiary Care Center. *Am J Forensic Med Pathol*. 2021 Mar 1;42(1):12–5.
34. Monasta L, Giangreco M, Ancona E, Barbone F, Bet E, Boschian-Bailo P, et al. Retrospective study 2005-2015 of all cases of fetal death occurred at =23 gestational weeks, in Friuli Venezia Giulia, Italy. *BMC Pregnancy Childbirth* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Apr 21];20(1):1–10.
35. Muin DA, Haslacher H, Koller V, Kiss H, Scharrer A, Farr A. Impact of fetal maceration grade on risk of maternal disseminated intravascular coagulation after intrauterine fetal death – A retrospective cohort study. *Sci Reports* 2018 81 [Internet]. 2018 Aug 24 [cited 2022 Apr 24];8(1):1–9.
36. Shelmerdine SC, Langan D, Mandalia U, Sebire NJ, Arthurs OJ. Maceration determines diagnostic yield of fetal and neonatal whole body post-mortem ultrasound. *Prenat Diagn*. 2020 Jan 1;40(2):232–43.
37. PORDATA - Idade média da mãe ao nascimento do primeiro filho [Internet]. [cited 2022 May 4]. Available from: <https://www.pordata.pt/Portugal/Idade+média+da+mãe+ao+nascimento+do+primeiro+filho-805>
38. Momo RJT, Fouedjio JH, Fouelifack FY, Mbu RE. Risk factors of intrauterine fetal death: a case control study at the maternity of Yaounde Central Hospital. *Int J Reprod Contraception, Obstet Gynecol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Apr 20];8(6):2149–55.
39. Algerian K. Chorioamnionitis: Establishing a correlation between clinical and histological diagnosis. *Indian J Pathol Microbiol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 May 10];63(1):44.
40. Redline RW, Ravishankar S. Fetal vascular malperfusion, an update. *APMIS* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 May 8];126(7):561–9.
41. Stol K, Jans J, Ott de Bruin L, Unger W, van Rossum A. Perinatal Infections With Ureaplasma. *Pediatr Infect Dis J*. 2021 May 1;40(5):S26–30.



Article

NOT USING PHOSPHOMOLYBDIC ACID IN MASSON'S TRICHROME: A SAFER ALTERNATIVE PROTOCOL FOR IMPROVING COLLAGEN STAINING?

Érica B. Martins¹, Beatriz Antunes¹, Carolina P. Santos¹, João Palma² and Amadeu Borges-Ferro^{1,*}

¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.

² Hospital de Vila Franca de Xira, EPE

* Correspondence: amadeu.ferro@estes.ipl.pt

Abstract: Histochemical techniques are relevant for laboratory diagnosis, leading to a growing need to optimize protocols. To highlight collagen in blue, Masson's Trichrome (MT) uses acid fuchsin, phosphomolybdic acid (PmA) and aniline blue. The principle used in this technique is based on the difference in permeability of the three-dimensional network of the precipitated cationic proteins and the size of the anionic compounds, known as the "permeability and diffusion theory", the staining being dependent on fixation and molecular size of the dyes. The phosphomolybdic acid (PmA) function is not clear and this chemical is harmful, corrosive and toxic to the environment. In this experimental study, we intended to compare the quality of MT staining, with and without using PmA, using different fixation times of tissues. Five swine organs (liver, kidney, tongue, lung and heart) were submitted to 12h, 24h, 48h and 96h fixation, histologically processed, sectioned and stained by MT, with and without PmA. Stained tissues were assessed by two experts using a data collection tool that generated a score on a 0-100 scale. According to the data obtained, 48h was the fixation time with the best results for MT staining quality. The results showed that, when individually analyzed, the quality of collagen staining without PmA was significantly higher ($t_{120,713}=-6,261$, $p<0,001$). The overall Final Score for TM showed differences between the method with and without PmA ($t_{158}=-3,287$, $p<0,001$), with final mean scores of 84.11 ± 8.23 and 88.48 ± 8.60 , respectively. In conclusion, the protocol without PmA demonstrated a better overall quality of MT staining.

Keywords: Masson's Trichrome staining, Phosphomolybdic Acid, Fixation, Collagen

1. Introduction

Histochemical techniques are relevant for pathological diagnosis, leading to a growing need to optimize laboratory protocols. Trichrome methods use three different stains and are frequently used to distinguish collagen from smooth muscle tissue in tumours and to identify increased collagen fibres in diseases, such as liver cirrhosis (1,2).

Masson's Trichrome (MT) staining uses acid fuchsin (AF), phosphomolybdic acid (PmA) and aniline blue (AB) (3). Weigert's ferric haematoxylin is used as nuclear contrast, which stains the nuclei black (4).

The principle used in this technique is based on the difference in permeability of the three-dimensional network of the precipitated cationic proteins and the size of the anionic compounds, known as the "permeability and diffusion theory", the staining being dependent on the fixation and molecular size of the dyes (5).

The 10% Neutral Buffered Formalin (10% NBF) used in Histopathology, is a fixation agent that creates methylene bridges between the proteins' amino acids, which causes the tissue porosity to be altered, creating a negative impact on techniques whose principle is the molecular size of the dyes (1).

When tissue protein components are exposed to the fixation agent, an interaction occurs between these elements, forming an insoluble three-dimensional network (1). Therefore, proteins from erythrocytes and muscle produce a "network" with small pores, while some types of collagens have a less dense and rather porous "network". Hence, the entry and diffusion of anionic dyes will occur according to their size (6). Small anionic dyes penetrate any network, and, in turn, large anionic dyes penetrate only collagen (4,7). These larger dyes can also be expected to have a higher affinity for proteins than smaller ones, due to their superior size and a greater number of binding sites (8,9).

Citation: Martins, E. B.; Antunes, B.; Santos, C. P.; Palma, J.; Borges-Ferro, A.. Not using phosphomolybdic acid in Masson's Trichrome: a safer alternative protocol for improving collagen staining?. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2023 Mar 11; 1(1): 29-36.

Academic Editor: Diana Martins

Received: 27 January 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 11 March 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences.

AF, with a molecular mass of 586 g/mol, is a small anionic dye that stains the cytoplasm of red blood cells and muscle red (1).

PmA is then used, with a molecular mass of 1825,25 g/mol¹, which acts as a differentiator of AF, removing it from collagen (10,11). AB, being a large-sized anionic dye (800 g/mol), enters only the collagen network, giving it a blue shade (1,12).

The relationship between the acid and the action of AB has not yet been proven so currently there are three main theories (12). Zeiger, in 1938, suggested that the differentiator was replaced by AB (13). However, in the same year, Otto pointed out that these were amphoteric, so the acid was used as a mordant, creating a greater number of binding charges between the AB and the tissues (3). Although Van der Waals forces have been widely demonstrated in this technique (14-18), there are studies (19-22) that have continued to ignore this data on the interaction of dyes with tissue structures through this type of non-ionic bonds. Currently, the most accepted theory is that PmA is retained through non-ionic interactions, while AB establishes ionic bonds with collagen (16).

According to European regulations, PmA is corrosive and can cause skin corrosion and serious eye damage (23). In addition, it cannot be discarded into sewage because it easily seeps into the soil, so recycling should be preferred to incineration or landfilling. Furthermore, it is toxic to aquatic life with long-lasting effects (23). In this way, the use of PmA entails economic expenses in the acquisition and appropriate disposal of the resulting waste, also increasing professional exposure and the duration of the technique.

1.1. Objectives

Given the lack of studies relating to fixation and porosity of the three-dimensional network, this study aimed to compare the quality of TM staining, with and without PmA, in tissues with different fixation times. The objectives were:

- a. To verify which fixation time presents a better quality of TM staining;
- b. To compare the quality of collagen and cytoplasm staining with and without PmA;
- c. To determine which of the protocols, with and without PmA, allows for a better global quality in the visualization of tissue structures.

2. Materials and Methods

A prospective experimental study was carried out in which observations were collected from the moment the research started (24,25).

The independent variables of the study were: a) sample type; b) fixation time and c) staining protocol. The tissue staining quality was considered the dependent variable.

The staining protocol was adapted from the Armed Forces Institute of Pathology and Bio-Optica Milano S.p.A (30,31) - see table 1.

Table 1. Masson's Trichrome staining protocols: conventional and experimental.

Conventional Protocol	Masson's Trichrome	Experimental Protocol
10 min	Deparaffinize	10 min
-	Hydrate to distilled water	-
5 min	1,2% Picric acid	5 min
-	Distilled water	-
10 min	Weigert Hematoxylin ¹⁰	10 min
5 min	Tap water	5 min
2 min	1% Acidic water	2 min
5 min	Ponceau Fucsin	5 min
2 min	1% Acidic water	2 min
10-15 min	1% Phosphomolybdic Acid	-
2 min	1% Acidic water	-
4 min	Anillin Blue	4 min
2 min	1% Acidic water	2 min
-	Dehydrate and mount	-

For this project, we used samples of swine tissue (liver, kidney, tongue, lung and heart), acquired from the slaughterhouse, whose cold ischemia time was 5 hours. These organs were chosen because they are extremely vascularized organs, with a significant amount of collagen in the walls of vessels and arteries (26-28).

The study started with the fixation in 10% NBF, at room temperature ($\pm 20^{\circ}\text{C}$), of 2 fragments from each organ for 12h, 24h, 48h and 96h, obtaining 10 fragments per time. These tissues were then processed and embedded in paraffin in a total of 40 paraffin blocks. Two sections 4 μm thick were obtained from each paraffin block, one for the MT Experimental Protocol (EP) and one for the MT Conventional Protocol (CP), and one section 3 μm thick for H&E control staining (29).

To evaluate the quality of the staining, a data collection tool was built, including the Scores for the following parameters, scored on a 3-level ordinal scale:

1. Morphological Preservation (MPS);
2. Intensity of Collagen Fibers Staining (ICFSS);
3. Specificity of Collagen Fibers Staining (SCFSS);
4. Intensity of Cytoplasm Staining (ICSS);
5. Specificity of Cytoplasm Staining (SCSS);
6. Non-Specific Staining (NSSS);
7. Nuclear Staining (NSS).

The slides were observed under the optical microscope by 2 independent assessors, using the above-mentioned instrument. The following formula was used to calculate the Final Score (scale 0-100): $[(\text{MPS} + \text{NSS})] + [(\text{SCFSS} + \text{SCSS} + \text{NSSS}) \times 2] + [(\text{ICFSS} + \text{ICSS}) \times 3] \times 3.57143$ (29,32).

To calculate the Intermediate Score (scale 0-10), associated with the quality of collagen and cytoplasm staining, the following formulas were used: collagen score = $(\text{SCFSS} \times 2) + (\text{ICFSS} \times 3)$; cytoplasm score = $(\text{SCSS} \times 2) + (\text{ICSS} \times 3)$.

The data obtained were treated using SPSS® software. One-way ANOVA test and Student's t-test were used with $\alpha \leq 0.05$.

3. Results

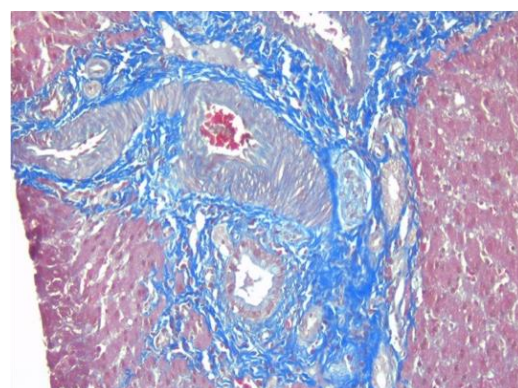
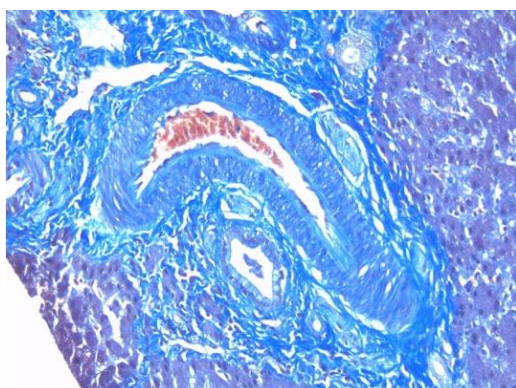
To assess the internal consistency of the data collection tool, Cronbach's α test was carried out, which revealed a coefficient of 0,995.

Mean Final Scores of MT staining were obtained for 12h EP: $91,07 \pm 1,48$; 24h EP: $83,92 \pm 2,44$; 48h EP: $92,14 \pm 1,02$; 96h EP: $86,79 \pm 1,97$. And also for 12h CP: $83,93 \pm 1,38$; 24h CP: $85,36 \pm 1,39$; 48h CP: $87,14 \pm 1,43$; 96h CP: $80,00 \pm 2,60$.

A one-way ANOVA test was performed to compare the effect of different fixation times on the quality of MT staining. When considering the EP, this test revealed a statistically significant difference between the fixation times of 24, 48 and 96 hours ($F_{(3, 156)} = 4.499$, $p = 0.005$). The Tukey post hoc test for multiple comparisons showed that the mean value of the Final Score was significantly higher at 48h when compared to 24h and 96h.

Looking at the CP results, the test revealed a statistically significant difference between the fixation times of 12, 24 and 48 hours ($F_{(3, 76)} = 4,460$, $p = 0,006$). The Tukey post hoc test also showed that the mean value of the Final Score was significantly higher at 48h when compared to 24h.

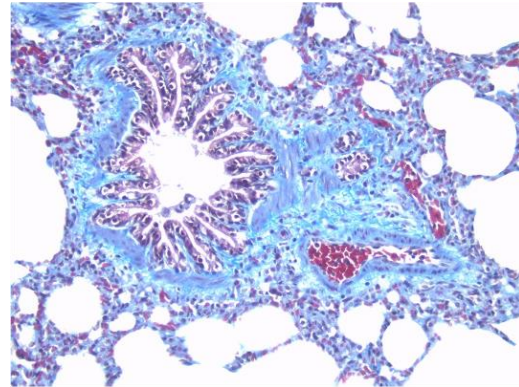
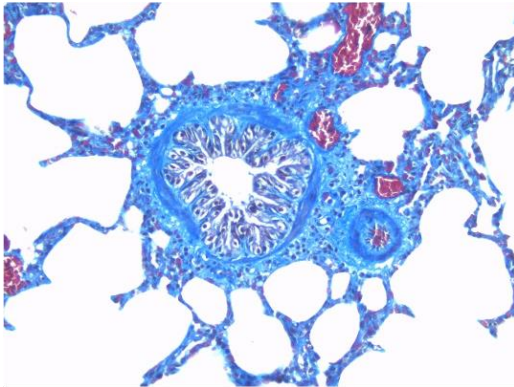
For the different fixation periods, MT staining without (EP) and with PmA (CP) results shown in figures 1 to 4 were obtained.



(a)

(b)

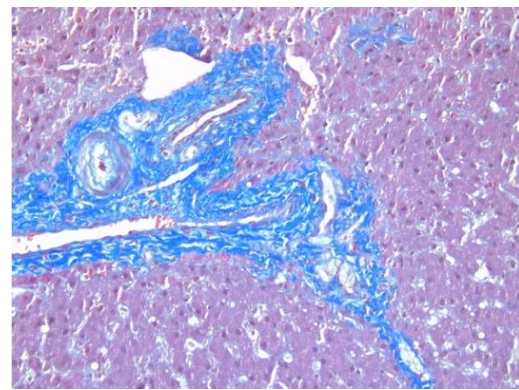
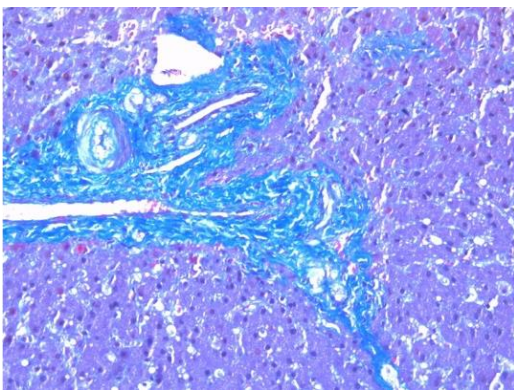
Figure 1. MT in liver section submitted to 12h fixation: (a) Experimental Protocol; (b) Conventional Protocol. (200x)



(a)

(b)

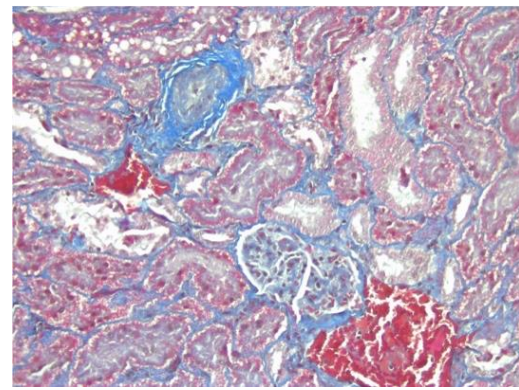
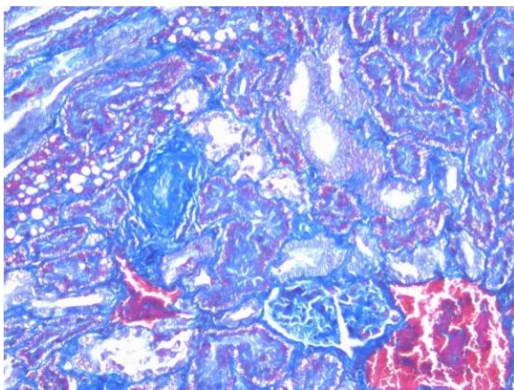
Figure 2. MT in lung Section submitted to 24h fixation: (a) Experimental protocol; (b) Conventional protocol. (200x)



(a)

(b)

Figure 3. MT in liver section submitted to a 48h fixation: (a) Experimental Protocol; (b) Conventional Protocol. (200x)



(a)

(b)

Figure 4. MT in kidney section submitted to 96h fixation: (a) Experimental Protocol; (b) Conventional Protocol. (200x)

To compare the quality of collagen staining, with and without the use of PmA, the respective scores (scale from 0 to 10) were analyzed. The CP presented a mean final score of $8,48 \pm 1,57$ and the EP obtained a mean of $9,73 \pm 0,84$. The paired samples t-test results for the quality of collagen staining between the two methods was $t_{79} = -6,175$, $p < 0,001$.

For the cytoplasm, the CP presented an average final score of $8,65 \pm 1,50$, and the EP obtained an average of $8,75 \pm 1,71$. The paired samples t-test results for the quality of cytoplasm staining between the two methods was $t_{79} = -0,601$, $p = 0,550$.

To evaluate the overall quality of both protocols we obtained a final score of $88,48 \pm 8,60$ for the EP and $84,11 \pm 8,23$ for the CP. The paired samples t-test results for the overall staining quality between the two methods was $t_{79} = -3,640$, $p < 0,001$.

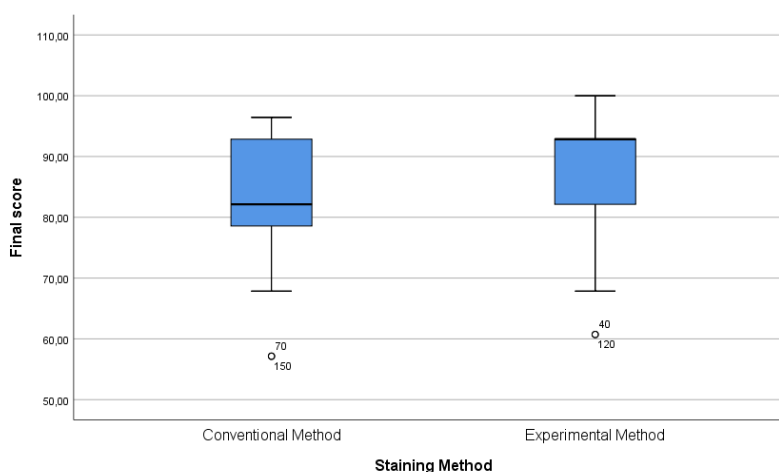


Chart 1. Presentation of the dispersion of final scores, with quartiles and median, for CP (left) and EP (right).

4. Discussion

From Cronbach's α coefficient of the assessment scale, we concluded that the measurement instruments used presented high internal consistency.

According to the data obtained, 48h was the time with the best results for MT staining quality. Based on the literature, it was expected that fixation times longer than 48 hours would show less satisfactory results than the others, as there would be a greater change in the three-dimensional network, making it more difficult for the AB dye to enter the collagen fibres (1). However, this study could not prove the variation of the three-dimensional network porosity with the variation of the fixation time, since although 96h showed lower results than 48h, it did not show significant differences when compared with 24h. Therefore, it would be advantageous to use electron microscopy to study the ultrastructure of the three-dimensional network with the variation of fixation times (33).

A paired samples t-test was performed to determine whether the use of PmA showed statistically significant differences in the collagen staining quality score. The results showed that the quality of collagen staining in the EP was significantly higher than in the CP. These results are not in agreement with the theory defended by Zeiger, since in the absence of PmA, there was no deficiency in staining by AB (13). In turn, the increase in the intensity of collagen staining in the absence of PmA was not in agreement with the theory of Otto (3), not allowing the results obtained to support the theory that PmA acts as an AB mordant.

According to the paired samples t-test, the quality of cytoplasm staining did not present statistically significant differences between the two methods. However, some slides obtained purplish cytoplasmic staining (figures 1A, 3A and 4A), when compared with the CP (figures 1B, 3B and 4B). Although there are no studies about this issue, it is thought that it may be related to the fact that PmA establishes bonds with AF, decreasing the free space in the pores of the three-dimensional network, which prevents the entry of the AB dye into the cytoplasm. Thus, in the absence of the differentiator, the "pockets" that constitute these structures are not filled by AF, so AB may also enter the cytoplasm, forming a purplish colouration. In the future, it would be pertinent to repeat the study, replacing the AF dye with a solution consisting of AF and Biebrich Scarlet. This

cytoplasmic solution may decrease the free space in these structures since AF presents a molecular mass of 586 g/mol and Biebrich Scarlet of 586,5 g/mol. Accordingly, there may be a lower probability of AB entering the cytoplasm.

It was demonstrated that the EP presented a higher mean Final Score when compared with the CP. Chart 1 shows that the 3rd quartile of the CP coincides with the median of the EP (92,86). Furthermore, it should be noted that the 4th quartile of the EP reaches the maximum score (100), unlike the CP. Thus, it can be inferred that the experimental method allowed for an increase in the quality of the MT staining.

4.1. Limitations

The limitations of this experimental study were that a new data collection tool was used, which had not been used before and requires further validation. Besides, the tissue sample was relatively small, so the results obtained for each fixation time cannot be extrapolated to other laboratory contexts.

In the future, it would be interesting to replicate this project using not only larger sample sizes but also to use postfixation agents like, for example, Gram's iodine or citrate buffer pH 4.0 (34).

5. Conclusions

In conclusion, the fixation time that presented a better quality of MT staining was 48h. When PmA was not used, the quality of collagen staining was better. The quality of cytoplasm staining did not show significant differences with and without the presence of PmA.

Concerning the global quality in the visualization of tissue structures, it can be concluded that the protocol without PmA achieved the best results.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgements: We would like to thank the assessors of this study, for making themselves available to participate in the realization of this project. We also want to thank Prof. Mário Maia Matos from *Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa* for reviewing this paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

6. References

1. Suvarna SK, Bancroft JD, Layton C. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th ed. Elsevier; 2019.
2. Assaw S. The use of modified Masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *Malaysian Journal of Veterinary research*. 2012 Jan 1;3:39–47.
3. Carleton HM, Drury RAB, Wallington EA. *Carleton's Histological technique*. 4th ed. New York: Oxford University Press; 1967.
4. Kiernan JA. Dyes and other colourants in microtechnique and biomedical research. *Coloration Technology*. 2006 Feb 1;122(1):1–21.
5. Moral RG del. *Laboratorio de anatomía patológica*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 1993.
6. Burdett BC. Influence of fibre structure on dye uptake. In: Bird CL, Boston WS, Worshipful Company of Dyers, Society of Dyers and Colourists, editors. *The Theory of coloration of textiles*. Dyers Co. Publications Trust; 1975. p. 111–62.
7. Sweat F, Puchtler H, Woo P. A light-fast modification of Lillie's allochrome stain. *Periodic Acid-Schiff-Picro-Sirius supra blue GL*. *Arch Pathol (Chic)*. 1964 Jul;78:73–5.

8. Horobin RW. Staining Methods Involving Dyeing. In: Horobin RW, editor. *Histochemistry*. Butterworth-Heinemann; 1982. p. 56–110.
9. Baker JR. *Principles of biological microtechnique; a study of fixation and dyeing*. London: Methuen; 1958.
10. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. 3rd ed. Chicago: ASCP Press; 2009.
11. Puchtler H, Isler H. The effect of phosphomolybdic acid on the stainability of connective tissues by various dyes. *J Histochem Cytochem*. 1958 Jul;6(4):265–70.
12. Everett MM, Miller WA. The role of phosphotungstic and phosphomolybdic acids in connective tissue staining I. *Histochemical studies*. *The Histochemical Journal*. 1974 Jan;6(1):25–34.
13. Zollinger H. Zusammenhänge zwischen Empiric und wissenschaftlichen Grundlagen beim Färben von Wolle. *Text-Prax*. 1962;17:165–71.
14. Valkó E. Particle Size in Wool Dyeing. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 1939 Apr 22;55(4):173–82.
15. Derbyshire AN, Peters RH. An Explanation of Dyeing Mechanisms in Terms of Non-polar Bonding. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 1955 Sep 22;71(9):530–6.
16. McGregor R. Developments in dyeing theories. *Rev Text Prog* 14. 1962. p. 348–57.
17. Zollinger H. The dye and the substrate: the role of hydrophobic bonding in dyeing processes. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 1965;81:345–50.
18. Peters RH. *Textile chemistry*. Vol. 3. Amsterdam Oxford New York: Elsevier; 1975.
19. Horobin RW. Structure-staining relationships in histochemistry and biological staining. *Journal of Microscopy*. 1980 Aug;119(3):345–55.
20. Horobin RW, Bennion PJ. The interrelation of the size and substantivity of dyes; the role of van der Waals attractions and hydrophobic bonding in biological staining. *Histochemie*. 1972 Sep;33(3):191–204.
21. Horobin RW, James NT. The staining of elastic fibres with Direct Blue 152. A general hypothesis for the staining of elastic fibres. *Histochemie*. 1970;22(4).
22. Horobin RW, Flemming L. Structure-staining relationships in histochemistry and biological staining. *Journal of Microscopy*. 1980 Aug;119(3):357–72.
23. Sigma-Aldrich. Specification Sheet - Phosphotungstic acid hydrate solution [Internet]. 455970. [cited 2021 Nov 1]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/product/aldrich/455970?gclid=Cj0KCQiA2ZCOBhDiARIsAMRfv9KdhYwAGu7u-8yYqshch9kz_D58F-rtwuMXcH-BOGuATWBFvjMU6jxgaAnZiEALw_wcB
24. Fortin MF. *O processo de investigação : da concepção à realização*. 5th ed. Loures: Lusociência; 2009.
25. Souza EL de, Lyra C de O, Costa ND, Rocha P de M, Uchoa A da C. *Metodologia da pesquisa: aplicabilidade em trabalhos científicos na área da saúde*. 2nd ed. Natal: EDUFRRN; 2019.
26. Junqueira LC, Carneiro J. *Junqueira & Carneiro: Histologia Básica*. 12th. Guanabara Koogan; 2013.
27. Ferro AB, Rodrigues AM, Pacheco MC. A Investigação em Anatomia Patológica: Caracterização de hábitos e frequências. *mícron*. 2005 Jul;13:40–6.

28. Santos FA dos, Pinho M. Atlas de Histologia Veterinária - Glândulas Anexas ao Tubo Digestivo [Internet]. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa. [cited 2021 Dec 23]. Available from: <http://atlashistologia.fmv.ulisboa.pt/atlas/?p=acessory&id=10>
29. Whiting P, Rutjes AWS, Reitsma JB, Bossuyt PMM, Kleijnen J. The development of QUADAS: A tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Medical Research Methodology*. 2003 Nov 10;3(1):1–13.
30. Luna LG, Armed Forces Institute of Pathology (U.S.). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York: Blakiston Division, McGraw-Hill; 1968.
31. Bio-Optica Milano S.p.A. Masson Trichrome with aniline blue. Milano; 2018 Jun. (04-010802). Report No.: 2.
32. Ferro AB. Immunohistochemistry results assessment – A scale based semiquantitative approach: the Global Immunohistochemistry Score (GIS). In: *An Essential guide to immunohistochemistry*. Nova Science Publishers; 2019.
33. Glauert AM. Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens (Practical Methods in Electron Microscopy). 1st ed. Vol. 1. Elsevier Science; 1987.
34. Yu Y, Chapman CM. Masson Trichrome Stain: Postfixation Substitutes. *Journal of Histotechnology*. June 2003;26(2):131–4.

Revisão

A importância do microbioma da pele na dermatite atópica: Revisão sistemática

Margarida Santos^{1†}, Maria Barbosa^{1†}, Sabrina Araújo^{1†}, Letícia Borges², Hadassa Santos² e Josiana Vaz^{3,4,*}

¹ Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal; MS: a45511@alunos.ipb.pt, MB: a42630@alunos.ipb.pt, SA:a42631@alunos.ipb.pt

² Centro Universitário do Sul De Minas, Varginha, Brasil; LB: letícia.borges@alunos.unis.edu.br; HS: hadassa.santos@professor.unis.edu.br

³ Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

⁴ Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal; josiana@ipb.pt

* Correspondence: josiana@ipb.pt; Tel.: +351936417152

† Os autores contribuíram de igual forma

Resumo: A dermatite atópica é uma doença crónica e inflamatória caracterizada pela alteração na microbiota da pele (microrganismos que colonizam a superfície da pele humana). Esta doença tem uma prevalência de 5-30% nas crianças e de 1-10% nos adultos, segundo os dados da World Allergy Organization. Deste modo é importante perceber se alterações na microbiota interferem na dermatite atópica, de forma a desenvolver terapêuticas mais eficientes. Assim, o objetivo deste trabalho foi relacionar o perfil da microbiota da pele em doentes com dermatite atópica e eficácia dos diferentes tratamentos em estudos randomizados e controlados. Para isso, desenvolveu-se uma análise sistemática respeitando as recomendações PRISMA, com recurso às bases de dados PubMed e ScienceDirect, usando como descritores: “skin AND (microbiome OR microbiota) AND atopic dermatitis”. Das publicações científicas identificadas, foram incluídos os estudos randomizados e controlados escritos em língua inglesa e portuguesa e em seres humanos. Foram identificadas 3715 publicações das quais 816 eram duplicadas, excluíram-se os artigos que investigassem unidades taxonómicas microbianas exclusivas e sem dados relevantes. Aplicados estes critérios obtiveram-se 11 estudos, da sua análise foi possível verificar consenso relativo à composição da microbiota quanto à predominância em *Staphylococcus aureus*, particularmente na fase aguda da doença, bem como, a relação deste predomínio com a sua gravidade. Quanto à terapêutica, foram testadas diferentes metodologias de tratamento, porém nenhuma delas demonstrou eficácia curativa. Fica evidente a necessidade de mais estudos que nos permitam um maior conhecimento sobre o perfil microbiano de forma a promover o desenvolvimento de novas opções ou estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: microbiota, DA, tratamento, *Staphylococcus aureus*

Citation: Santos, M.; Barbosa, M.; Sabrina, A.; Borges, L.; Santos, H.; Vaz, J. A importância do microbioma da pele na dermatite atópica: Revisão sistemática. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2023 Mar 11;1(1):37-49.

Academic Editor: Diana Martins

Received: 27 January 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 11 March 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences.

1. Introdução

A dermatite atópica (DA) é a doença inflamatória crónica da pele mais comum caracterizada por lesões cutâneas eczematosas e prurido em locais específicos do corpo. Desenvolve-se nos primeiros seis meses de vida em 45% dos pacientes (1,2), afetando 5-30% das crianças e 1-10% dos adultos a nível mundial em 2018, segundo os dados da World Allergy Organization (WAO) (3). Esta doença está associada à redução da qualidade de vida, ao aumento do risco de desenvolver asma, rinite alérgica, e alergias alimentares (4,5). Embora esteja a tornar-se cada vez mais comum em países industrializados, na maioria dos pacientes a DA finda espontânea antes da adolescência (5). O quadro clínico da DA varia substancialmente, dependendo da idade do paciente. Existem, pelo menos, 4 tipos diferentes: infantil (3 meses aos 2 anos), infância (2 aos 12 anos), adolescente/adulto (12 aos 60 anos) e idosos (acima dos 60 anos) (6).

É importante salientar que não existe um padrão para definir a DA como leve, moderado ou grave, devido a inexistência de um teste específico para diagnóstico. Apesar disso, existem medidas que permitem definir a gravidade e avaliar os resultados da terapia. Estas medidas podem ser objetivas por avaliações médicas, ou subjetivas através de sintomas relatados pelo paciente (7).

A relação entre a microbiota cutânea alterada da DA é bastante reconhecida clinicamente (8,9). Nos últimos anos, novos métodos e técnicas para estudar bactérias na pele, permitiram ter uma visão detalhada sobre as diferentes espécies e estirpes que colonizam a pele, bem como a relação entre a microbiota cutânea alterada e a DA (1).

A microbiota da pele humana refere-se a todas as comunidades de bactérias, fungos e vírus, que juntos constituem o microbioma cutâneo, estas residem na derme e epiderme (10).

Os tratamentos existentes visam restabelecer a integridade da barreira cutânea, promover a hidratação, controlo da inflamação e prurido, assim não erradicam a doença, apenas atenuam os sintomas da mesma durante o tratamento, sendo que após o término do mesmo os sintomas voltam. Além disso, apresenta a desvantagem de os pacientes serem submetidos a corticoides que alteram o microbioma e provocam resistências (3).

Uma vez que, a medição da gravidade da DA não é padronizada, existem ferramentas clínicas como é o exemplo do Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD) (11), Eczema Area and Severity Index (EASI) (12), critérios de Hanifin e Rajka (13), Therapeutic intervention scoring system (TISS) (14) e investigator's global assessment (IGA) (15), estes são índices de pontuação feitos para DA e são medidas válidas e confiáveis pelos profissionais baseadas em evidências. Para chegar ao diagnóstico da gravidade são avaliados sinais objetivos como: eritema; edema/pápulas; crostas; escoriações; liquenificação e secura. Também são avaliados sinais subjetivos como prurido e perda de sono (9).

Esta revisão sistemática visa proporcionar uma visão geral do microbioma da pele na DA e dar uma perspetiva das terapêuticos existentes. Irá discutir-se também futuros rumos na pesquisa da DA e da sua microbiota.

2. Métodos

A corrente revisão sistemática de artigos randomizados e controlados foi elaborada seguindo as recomendações da extensão PRISMA-S (16) e o fluxograma de PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) (17), como guia de pesquisa, uma vez que, fornece mais informações relativas ao processo de recuperação da informação, para diversas bases de dados e métodos de busca (16).

2.1. Questão de investigação, critérios de elegibilidade e estratégia de pesquisa

A questão de pesquisa e critérios de elegibilidade foram definidos de acordo com a estratégia PICO (18):

P (População): Humanos

I (Intervenção/Exposição): Estratégia terapêutica e composição da microbiota cutânea

C (Comparação): Indivíduos que sem intervenção (grupo controlo)

O (Avaliação/Resultados): Proporção de cada unidade taxonómica microbiana identificada e a resposta ao tratamento

Sendo a questão de investigação: Como a alteração do microbioma cutânea se relaciona com a DA?

A colheita e seleção de dados foi realizada por três autores independentes (MS, MB e SA) através da seleção das bases de dados científicas e avaliação da elegibilidade dos estudos controlados e randomizados, iniciado pela análise do título e resumo. Posteriormente, foi analisado o texto completo pelas três autoras de forma a verificar critérios de inclusão. Como não houve discrepância entre os revisores em relação a elegibilidade, inclusão ou não dos estudos, não existiu a necessidade de um quarto revisor.

Os registos foram organizados pelo *Mendeley* (software específico para gestão de bibliotecas). A extração e comprovação dos dados foi realizada por todos os autores. Tendo em conta o pequeno número de estudos e a heterogeneidade nos critérios de avaliação, foi criada uma síntese narrativa com parte dos resultados da presente revisão.

Os critérios de inclusão utilizados na procura dos estudos foram: artigos em língua inglesa e portuguesa; em seres humanos; estudos randomizados e controlados, que relacionem a dermatite atópica à diversidade do microbioma, publicados em *open access*. Relativamente aos critérios de

exclusão: artigos que investiguem unidades taxonômicas microbianas exclusivas e que não apresentem dados relevantes.

A pesquisa foi realizada a 2 de fevereiro de 2023 nas bases de dados bibliográficas da PubMed e ScienceDirect, utilizando os descritores: "skin AND (microbiome OR microbiota) AND atopic dermatitis".

2.2. Risco viés

O risco de viés foi avaliado usando a ferramenta ROB2_IRPG_beta_v9 da Cochrane (19) para os estudos randomizados e controlados.

A ferramenta avalia o risco de viés por meio da síntese dos resultados do estudo e não pela análise individual do estudo e seus resultados. É estruturada em cinco domínios que possuem "perguntas sinalizadoras", que são informações adicionais relevantes para a avaliação do risco de viés. As opções de resposta às "perguntas sinalizadoras" são: "sim", "provavelmente sim", "provavelmente não", "não", "não há informação" ou "não aplicável". As respostas definitivas "sim" e "não" frequentemente indicam que existem evidências sólidas. A opção "não aplicável" está disponível apenas para perguntas com resposta não obrigatória. Ao longo da utilização da plataforma, as respostas alimentam um algoritmo que determina o risco de viés para cada domínio: alto risco de viés, baixo risco de viés ou presença de alguma preocupação quanto ao viés. As respostas sinalizadoras confirmam os métodos adotados no estudo e sustentam o algoritmo para cada domínio (20).

Avalia a distribuição aleatória dos participantes, se foi ocultada, e se as diferenças entre os grupos interferiram na randomização. Avaliam se os participantes e o grupo estavam cientes da intervenção atribuída. Avalia o método de medição dos resultados, se a medição diferiu entre os grupos, se os avaliadores dos resultados sabiam da intervenção e se os resultados numéricos relatados foram selecionados com base na sua direção, magnitude e significância estatística. As opções de resposta para um julgamento geral de risco de viés são as mesmas para domínios individuais.

O risco de viés para um domínio individual tem implicância no risco geral. Portanto, um julgamento de "alto" risco de viés em qualquer domínio deve ter implicações semelhantes para o resultado como um todo, independentemente de qual domínio está a ser avaliado. "Algumas preocupações" em vários domínios podem levar os autores da revisão a decidir sobre um julgamento geral de "alto" risco de viés para esse resultado ou grupo de resultados (21).

3. Resultados

A pesquisa resultou em 3715 artigos, 695 na Pubmed e 3020 na ScienceDirect (figura 1). Com o auxílio do Excel, excluíram-se os artigos duplicados das duas bases de pesquisa (n=816). Em seguida, foram excluídos os estudos que não randomizados e controlados, ficando com 28 artigos de interesse. Baseados nos critérios de inclusão, excluíram-se 17 artigos: 7 artigos não publicados em acesso livre (*open access*), 7 por não se enquadrarem no tema, 1 por não ser em inglês ou português, 1 artigo com o estudo em animais e 1 por não apresentar resultados, no final foram obtidos 11 artigos elegíveis.

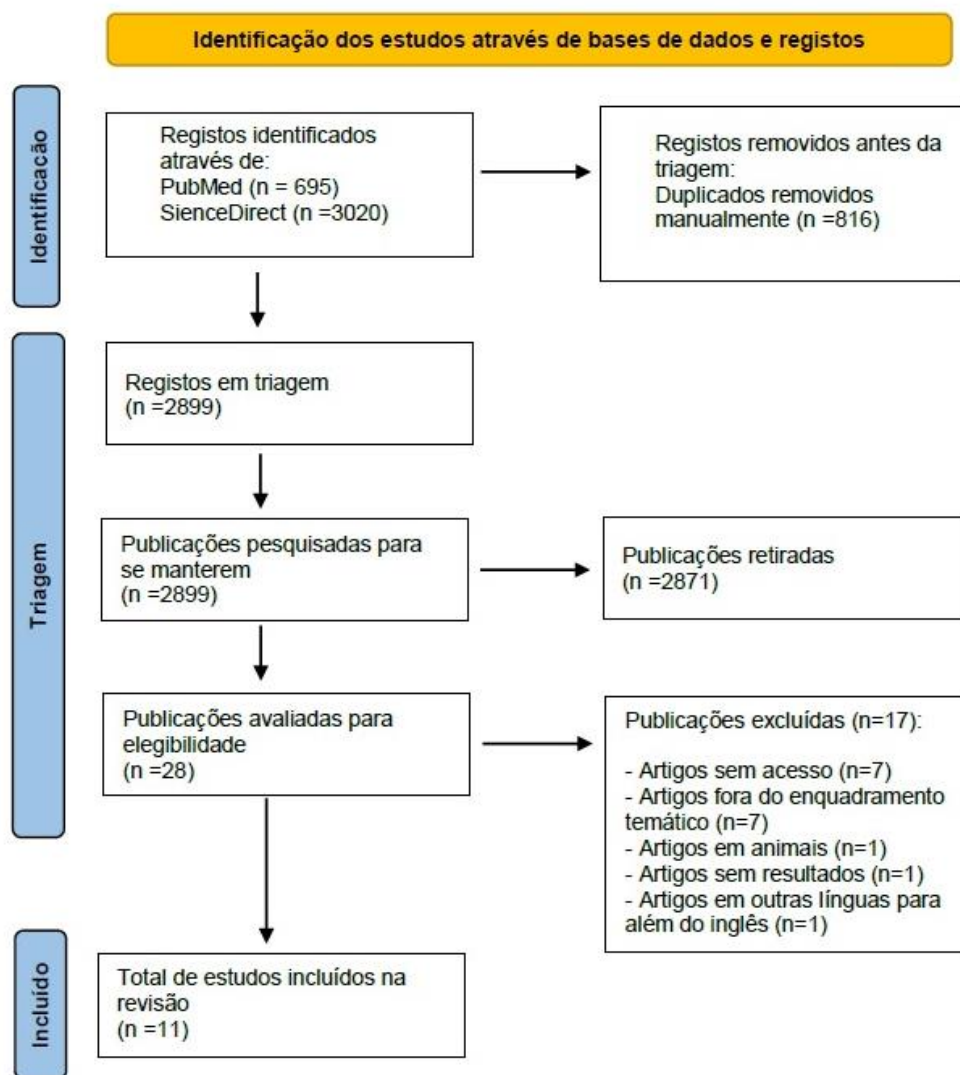


Figura 1. Fluxograma dos estudos

Da análise da tabela 1, podemos afirmar que os 11 artigos incluídos nesta revisão sistemática são randomizados e controlados, estes estudos variaram de 11 a 91 pessoas e a idade variou entre os 0 meses e 70 anos, ambos os sexos foram incluídos nos estudos analisados. Dos artigos analisados, 7 têm origem da América do Norte e Central (1,2,23-26,29), 3 na Europa (26-28) e 3 na Ásia (10,22,26), sendo que 1 estudo foi efetuado em 3 regiões diferentes (26).

Três artigos optaram por definir uma área de lesão (1,22,27), enquanto outros escolheram locais tipicamente afetados, como o antebraço, fossa antecubital, fossa poplíteia (2,24,25,28), pois os locais de estudo variam tendo em conta a idade e a gravidade da DA. Quatro estudos analisam lesões cutâneas não especificando área e local anatômico (10,23,26,19). A maioria optou por uma população com DA (2,10,22,25-29), 3 artigos usaram como controlo pessoas saudáveis (1,23,24) e 1 artigo em recém-nascidos teve como critério de seleção histórico familiar de DA (2).

A DA foi clinicamente caracterizada usando o SCORAD em 7 artigos (1,22,24-27,29) 5 artigos usam o EASI (10,23,25-27), 3 usam os Critérios de Hanifin e Rajka modificados (1,23,27), 2 usaram o IGA (26,27) e 1 usou o TISS (10).

O estudo de Zeng J. e colaboradores (2020) testou um tratamento com ozono na DA. Verificou-se uma descida do SCORAD de 22,15% após apenas 3 dias de tratamento. Assim sendo, a curto prazo esta terapia pode melhorar os sintomas os principais de DA: alívio da coceira e redução da inflamação. Para além disto verificou-se uma maior diversidade pós tratamento (22).

Dois estudos de Khadka VD. e colaboradores (2021) e Gonzalez ME. e colaboradores (2016), avaliaram o efeito dos banhos com lixívia diluída (BDD) juntamente com o uso de corticoides tópicos e o uso isolado de corticoides tópicos (1,23). Um estudo com duração de 3 meses, avaliou o efeito dos BDD, 2 vezes por semana, e uso de corticoides tópicos do tipo II a VI com o uso apenas dos corticoides tópicos referidos anteriormente, 2 vezes ao dia. Neste estudo foi concluído que os BDD melhoraram gradualmente o SCORAD em locais afetados pela DA. Diminuindo a colonização por *S. aureus* e aumentando a diversidade da microbiota, fazendo com que esta se assemelhe com os controlos saudáveis (1). O outro estudo teve duração apenas de 4 semanas, seguindo o mesmo procedimento que o anterior, mas sem especificar o tipo de corticoides usados. Este concluiu que ambos os tratamentos obtiveram um resultado semelhante no que diz respeito à composição da microbiota da pele. Embora tenha havido uma melhoria na sintomatologia dos participantes segundo o EASI score, a área lesionada não pode ser comparada ainda com os controlos saudáveis, mas sim com a composição das áreas não lesionais (23).

O estudo Lydia A. e seus colaboradores (2021) incluiu 22 participantes, 11 com DA e 11 saudáveis. Consistiu na imersão de um dos braços em vinagre de maçã diluído (0,5 % de ácido acético) e o outro braço água da torneira por 10 min diariamente. Os resultados do estudo da microbiota foram semelhantes entre os indivíduos com DA tratados com o vinagre de maçã e com a água da torneira, ou seja, não houve diferenças no microbioma da pele após 2 semanas de tratamento. Realçaram a consistência dos resultados do estudo, em relação a estudos anteriores que mostram a estabilidade temporal da microbiota da pele. Apesar de verificarem uma maior abundância relativa de *S. aureus* em indivíduos com DA do que em pele saudável, a diversidade microbiana revelou-se semelhante entre os dois grupos de estudo (24).

O estudo de Callewaert C. e seus colaboradores (2020) avaliou o efeito do tratamento com Dupilumab na microbioma em pacientes com DA. Dupilumab é um anticorpo monoclonal humano que inibe a sinalização hiperativa de IL-4 e IL-13. O tratamento com Dupilumab reverteu a comunidade microbiana associada à DA durante o tratamento. A normalização da comunidade microbiana da pele correlacionou-se com a diminuição da concentração de biomarcadores séricos (TARC/PARC) e a melhora dos sinais e dos sintomas clínicos da DA. A abundância relativa de *Staphylococcus* spp diminuiu durante o tratamento com Dupilumab em locais lesionais e não lesionais, mas a redução mais pronunciada foi observada nas amostras de pele lesional. Essa diminuição na abundância de *Staphylococcus* spp foi observada já na semana 4 e foi mantida até a semana 32. Uma abundância relativa de unidades taxonómicas bacterianas na pele lesionada para pacientes individuais tratados com Dupilumab. Na semana 32 (16 semanas após o tratamento), a abundância de *S. aureus* voltou a aumentar. No grupo placebo, a abundância absoluta de *S. aureus* não mudou de forma significativa durante o tratamento com Dupilumab. Esses resultados revelam fortes ligações entre a comunidade microbiana da pele e a gravidade da DA (25).

O estudo Lisa A. e seus colaboradores (2022) realizado em diferentes países, avaliou o efeito do Tralokinumab (anticorpo monoclonal que atua na neutralização IL-13) na DA moderada a grave, em pacientes adultos. O tratamento levou a uma redução relativa de *Staphylococcus* spp na pele lesionada, em 38,9% na semana 8 e 47,5% na semana 16. De destacar a diminuição do *S. aureus*, que constituía 32% do microbioma no início do tratamento e passadas 16 semanas revelou apenas 8%. Estes resultados sugerem que a inibição IL-13 pode permitir uma resposta inata mais eficaz na redução de *S. aureus* (26).

O estudo Know S. e seus colaboradores (2019) avaliou o efeito do tratamento com corticoides tópicos e ultravioleta B de banda estreita em 3 momentos: antes do tratamento, após 6 semanas de tratamento e 3 semanas após a descontinuação do tratamento. A abundância relativa de *S. aureus* na pele lesionada diminuiu drasticamente após o tratamento. Este achado é consistente com estudos anteriores, em que se verificou que, a densidade da colonização se correlaciona com a gravidade do eczema, assim como, que a taxa de colonização de *S. aureus* e a densidade na pele não lesionada são significativamente menores do que as da pele lesionada, mas ainda maiores do que as da pele saudável (10).

O estudo Glats M. e seus colaboradores (2018) incluiu 23 crianças com histórico familiar de DA. A seleção e randomização foi feita logo após o nascimento e aos 6 meses foram colhidas as amostras de pele. Das 23, 11 foram tratadas com emolientes desde o nascimento e as restantes 12 participaram no grupo controlo. 4 crianças desenvolveram DA no período do estudo (1 do grupo de intervenção e 3 do grupo controlo). Para excluir os potenciais efeitos da DA nas comunidades bacterianas da pele só se efetuaram análises da diversidade microbiana a bebés que não desenvolveram DA durante o tratamento, 10 do grupo do emoliente e 9 do grupo controlo. Colheram 114 amostras de 19 indivíduos, para os estudos da diversidade microbiana e verificaram uma

maior abundância do *S. salivarius* em pacientes que receberam o tratamento, ao contrário do grupo controlo em que *S. mitis* é o mais predominante. E denotam ainda que os *Streptococcus spp* contribui significativamente nas mudanças nas comunidades bacterianas da pele, comparando amostras de controlos com as amostras dos participantes tratados com emoliente (2).

O estudo Weiss A. e seus colaboradores (2022) investigou o impacto de niclosamida (formulação tópica) na colonização por *S. aureus* e na composição do microbioma da pele em pacientes com DA leve a grave. Os 36 participantes foram divididos em 2 grupos de 18, e foram escolhidas duas lesões em lados opostos do corpo. Num lado se aplicou a formulação com niclosamida e do outro um gel controlo, sendo que um dos grupos aplicaria a pomada com niclosamida 1 vez ao dia e o outro grupo 2 vezes ao dia. Posto isto, verificaram que o tratamento duas vezes ao dia reduz efetivamente a colonização por *S. aureus* na análise quantitativa e aumenta a diversidade do microbioma (27).

O estudo Kolk T. e seus colaboradores (2020) testou a eficácia, a farmacodinâmica e a segurança de duas concentrações de Omiganan tópico (1% e 2,5%) 1 vez ao dia em pacientes com DA leve a moderada durante 28 dias em apenas 1 lesão. Omiganan é um análogo de indolicidina com propriedades antimicrobianas. Observaram uma mudança da microbiota cutânea entra a área lesionada e não lesionada em ambos os grupos de tratamento com omiganan. Em contraste com o grupo controlo em que não havia diferenças. A presença do género *Staphylococcus* dominou a pele lesionada. Assim, o tratamento com Omiganan tópico melhorou a disbiose em pacientes com dermatite atópica leve a moderada, e melhorias pequenas, mas estatisticamente significativas, no prurido. Após ambos os tratamentos, a abundância de *Staphylococcus spp* diminuiu significativamente de 64% para 37% na concentração de 1% e de 70% para 42% quando usado o tópico a 2,5%. No grupo controlo enquanto a composição da microbiota cutânea permaneceu estável (28).

O estudo de Laura Carucci e colaboradores (2022) avaliou o efeito da ingestão de um probiótico (*Lactocaseibacillus rhamnosus GG (LGG)*) em 45 pacientes com idades entre os 6 e os 36 meses, durante um período de 12 semanas. Foram marcadas visitas de acompanhamento mensais durante os 4 meses, na primeira e última visita foram colhidas: 2 amostras de zaragatoa de pele (1 de área de pele lesionada e outra de área de pele sem lesão). No que toca ao microbioma da pele não foram encontradas diferenças entre os dois grupos em estudo, mas denota-se uma melhora entre as duas áreas da pele (afetada e não afetada) (29).

Tabela 1. Descrição dos tratamentos em estudo.

Estudo	País	N	Intervalo de idades (anos)	Área analisada	Dose	Medidas fisiológicas e clínicas	Resultados
Zeng J (22)	China	12 DA	6-28	lesões cutâneas com de 4*4 cm ² e áreas não lesionadas	Banho de água ozonizada (3,0 ± 1,5 mg/L) 15 min, seguido de óleo de camélia ozonizado tópico, por dia	SCORAD	<i>Staphylococcus spp</i> dominou na microbiota lesional, variando de 59 a 99 %, diminuindo após tratamento. Na pele não lesional o <i>Staphylococcus spp</i> dominava em 31,55 ± 30,76%, porém a sua abundância diminuiu, de forma insignificante, após a terapia com ozono. O SCORAD caiu 22,15% após três dias de tratamento.
Khadka VD (1)	México	14 ctl saudáveis 28 DA	5-18	Lesões cutâneas com mais de 5 cm ²	Corticóides tópicos duas vezes ao dia sem BDD . Outro grupo BDD numa concentração de 0,006% 10-15 min duas vezes por semana.	SCORAD Critérios de Hanifin e Rajka modificados	<i>S. aureus</i> domina o microbioma em locais de lesão (36,35%), após o tratamento este reduz (31,83%), enquanto outras espécies aumentam.
Gonzalez ME (23)	EUA	14 ctl saudáveis 18 DA	3 meses-5	Lesões cutâneas	Corticosteroides tópicos num grupo, e corticosteróides tópicos mais BDD 2 vezes por semana noutro	EASI e Critérios de Hanifin e Rajka modificados	Na pele lesionada a abundância de <i>S. aureus</i> foi de 60% a 70%. No grupo que usou BDD apresentaram um menor valor de <i>S. aureus</i> . Após os tratamentos <i>S.aureus</i> foi substituído por <i>Corynebacterium</i> , <i>Prevotella</i> e <i>Acinetobacter</i> .
Lydia A. (24)	EUA	11 ctl saudáveis 11 DA	>12 anos	Lesão cutânea no antebraço	Vinagre de maçã diluído (0.5% de ácido acético) e o outro antebraço em água da torneira durante 10 minutos, diariamente.	SCORAD	Não houve mudança na diversidade significativa microbiana de indivíduos com DA após 2 semanas de tratamento diário com água ou vinagre de maçã.
Cal-lewaert C (25)	EUA	26 no grupo dupilumab 25 no grupo placebo	18	Na pele lesional da fossa antecubital e pele não lesional parte superior do braço	dose de ataque de 400 mg de dupilumab (ou placebo) seguida de 200 mg de dupilumab (ou placebo) todas as semanas.	SCORAD e EASI	A diversidade microbiana aumentou ao longo do tratamento. O <i>Staphylococcus spp</i> foi o gênero mais abundante em pacientes com DA, 61% na pele lesionada e 50% na não lesionada. A abundância de <i>staphylococcus</i> diminuiu com o tratamento para 35% nos dois locais. Após 18 semanas do fim do tratamento perdeu o efeito, voltando aos valores iniciais.

Lisa A. (26)	EUA Europa Japão	59 no grupo traloquinumab e 25 no grupo placebo	> 18	Lesões cutâneas	600mg de traloquinu- mabe ou placebo no início, nas 16 semanas seguintes aplicaram 300g traloquinumabe ou placebo uma vez a cada 2 semanas, depois até á 32 semana aplica- ram 300mg 1 vez a cada 4 semanas.	EASI, SCORAD IGA	A microbiota permaneceu está- vel em pacientes que recebe- ram placebo. O <i>Staphylococcus</i> <i>spp</i> foi o gênero mais abun- dante em pacientes com DA, e reduziu significativamente com o tratamento 38.9% na semana 8 e 47.5% na semana 16.
Kwon S (10)	Coreia	5 ctl com DA e 6 ultravioleta B	5-40	Lesões cutâneas	Um grupo com 5 participantes tratado com corticóide tópico e o outro grupo com 6 tratado com corticoides topicos e ultravioleta B de banda estreita	TISS e EASI	O <i>S.aureus</i> compreendeu (72,5%) da pele lesionada, e apenas (28,5%) em pele não le- sionada de pacientes com DA. Esta abundância de <i>S.aureus</i> di- minuiu drasticamente com o tratamento.
Glatz M. (2)	EUA	Com história familiar de DA, 10 no grupo de emolientes e 9 no grupo pla- cebo	0 aos 6 meses	Bochecha, dorso e antebraço	Aplicar o emoliente em todas as partes do corpo, exceto couro ca- beludo e na área das fraldas e evitar banho por pelo menos 24 ho- ras, começou 3 sema- nas após o nascimento com duração de 6 me- ses.	Não menciona	Diversidade microbiana maior no grupo que recebeu o trata- mento. Proporção de <i>Staphylo-</i> <i>coccus</i> menor em latentes com DA em relação aos sem DA. A sua abundância aumentou nos pacientes que receberam o tra- tamento dos emolientes.
Weiss A. (27)	Dinamarca	18 Grupo niclosamida 1x 18 grupo niclo- samida 2x	18-70 anos	lesões de 10 a 200 cm	Aplicação da pomada ATx201 POMADA 2% 7 dias, um grupo aplicava 1 vez por dia e o outro 2 vezes por dia,	EASI IGA Critérios de Hani- fin e Rajka modi- ficados	Verificaram que o tratamento duas vezes ao dia com ATx201 POMADA 2% reduz a coloniza- ção por <i>S. aureus</i> em 94,4%, e leva a um aumento da diversi- dade do microbioma.
Kolk T. (28)	Holanda	12 grupo omiganan 1% 12 omiganan 2,5% 12 ctl DA	18-65 anos	Uma lesão na fossa antecubital	Aplicação de pomada omiganan 1% e omiganan 2,5% durante 28 dias	SCORAD	Após ambos os tratamentos a abundância de <i>Staphylococcus</i> <i>spp</i> diminuiu de 64% para 37% para omiganan 1% e de 70% para 42% para omiganan 2,5% em comparação com grupo con- trole em que a abundância per- maneceu estável. Com a dimi- nuição do <i>Staphylococcus spp</i> , a diversidade do microbioma au- mentou.

4. Discussão

Os artigos elegidos para a presente revisão sistemática apresentam um alto grau de qualidade, tendo em conta a análise do risco de viés, que confere segurança nos resultados encontrados.

Da análise, dos 11 estudos, verificou-se que existem diferenças perceptíveis entre a microbiota da DA e a microbiota da pele normal, atualmente é aceite pela comunidade científica que a DA está fortemente relacionada com a colonização da pele por *S. aureus*. Assim sendo, a gravidade das lesões está também associada à predominância relativa de *S. aureus* na microbiota cutânea (1,22,23), enquanto outros grandes grupos de bactérias da pele se encontram em menor proporção (10,23,30). Estima-se que o *S. aureus* ocupa mais de 90% do microbioma da pele lesionada de pacientes com DA e contribui para os frequentes surtos e agravamentos da doença (10). Em todos os estudos analisados existe uma concordância relativa ao aumento dos *Staphylococcus spp* na pele com DA, variando entre 36,35 e 72,5% (1,10), o mesmo não se verifica nas restantes espécies de bactérias analisadas (1,2,10,16,18). Entre indivíduos saudáveis, a composição microbiana da pele varia, mas em geral, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* estão entre as mais abundantes (22). A composição da microbiota depende do local anatómico e está relacionada com o nível de humidade e oleosidade da pele, estando alterada na DA (1,22,23)

A disfunção da barreira da pele na DA é observada na pele lesionada e não lesionada dos pacientes afetados. Esta é evidenciada por elevados marcadores de permeabilidade epidérmica incluindo perda de água transepitérmica, aumento de pH, aumento da permeabilidade, redução da retenção de água e aumento da suscetibilidade à infeção (31) por bactérias oportunistas como o *S. aureus*, que por sua vez, induz a inflamação na pele e agrava a DA (2,32). Assim, pode existir um ciclo, que com a deficiência na barreira da pele e consequente aumento do pH, leva a uma maior colonização de *S. aureus*, que através da expressão de fatores de virulência podem induzir a inflamação da pele e contribuir para um maior comprometimento desta barreira potenciando um desequilíbrio na microbiota cutânea (32). O comprometimento prolongado desta barreira, predis põem os pacientes à sensibilização cutânea e ao subsequente desenvolvimento de doenças atópicas associadas (5).

Dos artigos analisados apenas dois não apresentam melhorias significativas na microbiota da pele, sendo que um avalia a ingestão de um probiótico (29) e outro a imersão da pele em vinagre de maçã (24). Já os restantes estudos evidenciam uma melhora na microbiota bem como dos sintomas após os tratamentos. Apenas 3 artigos utilizam como controlo indivíduos saudáveis (1, 23, 24), os restantes artigos utilizaram placebo pacientes com DA. Um dos estudos que usam banhos de lixívia diluídos como tratamento refere que embora a melhora dos sintomas e a maior diversidade a pele com DA ainda não se assemelha ao microbioma dos controlos (1). Outros estudos, tais como o que usa os banhos de lixívia diluídos, assim como o ozono tópico e o Dupilumab referem que existiu uma melhora dos sintomas, mas não comparam com a pele dos controlos (16, 22 e 23).

Nos restantes artigos verificou-se uma semelhança relativa aos resultados, sendo que estes descrevem um aumento da diversidade microbiana na pele, realçando a diminuição dos *S. aureus* após os tratamentos. (1, 2, 10, 23, 22, 25-28). Os tratamentos apresentaram resultados benéficos, mas o que se verifica comumente é que após o tratamento os sintomas voltam à fase inicial, não garantindo uma total eficácia.

Durante a pesquisa verificou-se um aumento exponencial de artigos publicados nesta área. Como a prevalência de DA tem vindo a aumentar, denota-se uma necessidade na comunidade científica de obter mais conhecimento. Os tratamentos já testados têm uma eficácia provisória durante a sua aplicação, atenuando os sintomas, sendo que, após o término todo o processo regride para o estado da doença anterior ao tratamento, posto isto é necessário desenvolver opções terapêuticas com efeitos a longo prazo.

A avaliação do risco de viés de um estudo é uma etapa essencial da prática clínica baseada em evidências e do processo de desenvolvimento de uma revisão sistemática. Ignorar potenciais vieses dos estudos primários incluídos numa revisão sistemática pode impactar diretamente nos resultados e levar a conclusões erróneas. Os 11 estudos incluídos foram conduzidos de forma a minimizar erros sistemáticos, sendo que todos os artigos analisados apresentam um baixo risco de viés. O que leva a crer que não existiram desvios nos resultados reais dos tratamentos analisados.

5. Conclusão

Cada vez mais o microbioma da pele tem sido estudado como forma de atenuar e tratar a DA, com isso tem surgido estudos que têm trazido uma maior compreensão da relação do microbioma cutâneo alterado e a DA. No entanto, a divergência de resultados entre os artigos analisados nesta revisão torna evidente a necessidade de desenvolver mais pesquisas nesta área. Sabe-se que o agravamento da DA tem sido associado à presença dominante das espécies de *Staphylococcus* spp, contudo existe alguma incerteza quanto à presença e proporção de microrganismos como *Propionibacterium*, *Streptococcus* e *Acinetobacter*. Com o aumento exponencial da DA tem surgido uma maior necessidade de aprofundar o conhecimento acerca da mesma, visando obter um tratamento curativo para esta doença crónica. Assim, novas medidas clínicas podem ser investigadas, acompanhando estes doentes durante períodos mais longos e avaliando os potenciais fatores que alteram o microbioma. Devem ser estudados tratamentos mais eficazes e seguros.

Contribuições dos autores: Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito. A autoria deve ser limitada àqueles que contribuíram substancialmente para o trabalho relatado.

Agradecimentos: JV agradece à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) e aos fundos nacionais FCT/MCTES (PIDDAC) pelo apoio financeiro ao CIMO (UIDB/00690/2020 e UIDP/00690/2020) e SusTEC (LA/P/0007/2020).

Conflitos de Interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

6. Referências

1. Khadka VD, Key FM, Romo-González C, Martínez-Gayosso A, Campos-Cabrera BL, Gerónimo-Gallegos A, et al. The Skin Microbiome of Patients With Atopic Dermatitis Normalizes Gradually During Treatment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2021 Sep 24;11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34631601/> DOI: 10.3389/fcimb.2021.720674
2. Glatz M, Jo J-H, Kennedy EA, Polley EC, Segre JA, Simpson EL, et al. Emollient use alters skin barrier and microbes in infants at risk for developing atopic dermatitis. Flores GE, editor [Internet]. *PLOS ONE*. 2018 Feb 28;13(2):e0192443. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29489859/> DOI: 10.1371/journal.pone.0192443
3. World Allergy Organization [Internet]. *Worldallergy.org*. 2019. Available from: <https://www.worldallergy.org/>
4. Moosbrugger-Martinz V, Hackl H, Gruber R, Pilecky M, Knabl L, Orth-Höller D, et al. Initial Evidence of Distinguishable Bacterial and Fungal Dysbiosis in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis or Netherton Syndrome. *The Journal of Investigative Dermatology* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Feb 14];141(1):114–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32553662/> DOI: 10.1016/j.jid.2020.05.102
5. Myles IA, Earland NJ, Anderson ED, Moore IN, Kieh MD, Williams KW, et al. First-in-human topical microbiome transplantation with *Roseomonas mucosa* for atopic dermatitis. *JCI Insight* [Internet]. 2018 May 3;3(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29720571/> DOI: 10.1172/jci.insight.120608
6. Bieber T, D’Erme AM, Akdis CA, Traidl-Hoffmann C, Lauener R, Schäppi G, et al. Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2017 Apr;139(4):S58–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28390478/> DOI: 10.1016/j.jaci.2017.01.008
7. Gooderham MJ, Hong C, Albrecht L, Bissonnette R, Dhadwal G, Gniadecki R, et al. Approach to the Assessment and Management of Adult Patients With Atopic Dermatitis: A Consensus Document. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* [Internet]. 2018 Nov;22(1_suppl):3S5S. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30439298/> DOI: 10.1177/1203475418803627
8. Van den Bogaard EH, Bergboer JGM, Vonk-Bergers M, van Vlijmen-Willems IMJJ, Hato SV, van der Valk PGM, et al. Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2013 Feb 1;123(2):917–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23348739/> DOI: 10.1172/JCI65642
9. Yu J, Luo Y, Zhu Z, Zhou, Y Sun L, Gao J et al. A tryptophan metabolite of the skin microbiota attenuates inflammation in patients with atopic dermatitis through the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2019;143(6):2108–2119.e12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30578876/> DOI: 10.1016/j.jaci.2018.11.036
10. Kwon S, Choi J, Shin J, Huh C, Park K, Du M, et al. Changes in Lesional and Non-lesional Skin Microbiome During Treatment of Atopic Dermatitis. *Acta Dermato Venereologica* [Internet]. 2019;99(3):284–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30460369/> DOI: 10.2340/00015555-3089

11. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. 2014 Feb;70(2):338–51. Available from: [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(13\)01095-5/abstract](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(13)01095-5/abstract) DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.10.010>
12. Hanifin JM, Thurston M, Omoto M, Cherill R, Tofte SJ, Graeber M, et al. The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology* [Internet]. 2001 Feb;10(1):11–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11168575/> DOI: 10.1034/j.1600-0625.2001.100102.x
13. Hanifin JM, Cooper KD, Ho VC, Kang S, Krafchik BR, Margolis DJ, et al. Guidelines of care for atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. 2004 Mar;50(3):391–404. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4326095/> DOI: 10.1016/j.jaad.2014.03.023
14. Kaufmann I, Briegel J. Therapeutic Intervention Scoring System (TISS) - a method for calculating costs in the intensive care unit (ICU) and intermediate care unit (IMCU). *Critical Care* [Internet]. 2000;4(Suppl 1):P243. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3333165/> DOI: 10.1186/cc962
15. Langley RGB, Feldman SR, Nyirady J, van de Kerkhof P, Papavassilis C. The 5-point Investigator's Global Assessment (IGA) Scale: A modified tool for evaluating plaque psoriasis severity in clinical trials. *Journal of Dermatological Treatment* [Internet]. 2013 Dec 20;26(1):23–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24354461/> DOI: 10.3109/09546634.2013.865009
16. Rethlefsen ML, Kirtley S, Waffenschmidt S, Ayala AP, Moher D, Page MJ, et al. PRISMA-S: an extension to the PRISMA Statement for Reporting Literature Searches in Systematic Reviews. *Systematic Reviews* [Internet]. 2021 Jan 26;10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33499930/> DOI: 10.1186/s13643-020-01542-z
17. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *British Medical Journal* [Internet]. 2021 Mar 29;372(71):n71. Available from: <https://www.bmj.com/content/372/bmj.n71> DOI:10.1136/bmj.n71
18. Santos CM da C, Pimenta CA de M, Nobre MRC. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. *Revista Latino-Americana de Enfermagem* [Internet]. 2007 Jun;15(3):508–11. Available from: <https://www.scielo.br/j/rlae/a/CfKNnz8mvSqVjZ37Z77pFsy/?lang=en> DOI:10.1590/S0104-11692007000300023
19. Higgins JPT, Altman DG, Gotzsche PC, Juni P, Moher D, Oxman AD, et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ* [Internet]. 2011 Oct 18;343. Available from: <https://www.bmj.com/content/343/bmj.d5928> DOI:10.1136/bmj.d5928
20. Ma L-L, Wang Y-Y, Yang Z-H, Huang D, Weng H, Zeng X-T. Methodological quality (risk of bias) assessment tools for primary and secondary medical studies: what are they and which is better? *Military Medical Research* [Internet]. 2020 Feb 29;7(7). Available from: DOI:10.1186/s40779-020-00238-8
21. Sterne JAC, Savović J, Page MJ, Elbers RG, Blencowe NS, Boutron I, et al. RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ* [Internet]. 2019 Aug 28;366(1):l4898. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31462531/> DOI: 10.1136/bmj.l4898
22. Zeng J, Dou J, Gao L, Xiang Y, Huang J, Ding S Topical ozone therapy restores microbiome diversity in atopic dermatitis. *International immunopharmacology* [Internet]. 2020;80:106191. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31986325/> DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106191
23. Gonzalez ME, Schaffer J V, Orlov SJ, Gao Z, Li H, Aleksayenko A V., et al. Cutaneous microbiome effects of fluticasone propionate cream and adjunctive bleach baths in childhood atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. 2016;75(3):481-493.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27543211/> DOI: 10.1016/j.jaad.2016.04.066
24. Luu LA, Flowers RH, Kellams AL, Zeichner S, Preston DC, Zlotoff BJ, et al. Apple cider vinegar soaks [0.5%] as a treatment for atopic dermatitis do not improve skin barrier integrity. *Pediatric Dermatology* [Internet]. 2019 Jul 22;36(5):634–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31328306/> DOI: 10.1111/pde.13888
25. Callewaert C, Nakatsuji T, Knight R, Kosciolk T, Vrbanac A, Kotol P, P., et al. (2020). IL-4Rα Blockade by Dupilumab Decreases Staphylococcus aureus Colonization and Increases Microbial Diversity in Atopic Dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* [Internet]. 2020;140(1):191-202.e7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31252032/> DOI: 10.1016/j.jid.2019.05.024
26. Beck LA, Bieber T, Weidinger S, Tauber M, Saeki H, Irvine AD, et al. Tralokinumab treatment improves the skin microbiota by increasing the microbial diversity in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis: Analysis of microbial diversity in ECZTRA 1, a randomized controlled trial. *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. 2022 Dec; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36473633/> DOI: 10.1016/j.jaad.2022.11.047
27. Weiss A, Delavenne E, Matias C, Lagler H, Simon D, Li P, et al. Topical niclosamide (ATx201) reduces Staphylococcus aureus colonization and increases Shannon diversity of the skin microbiome in atopic dermatitis patients in a randomized, double-blind, placebo-controlled Phase 2 trial. *Clinical and Translational Medicine* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2023 Feb 14];12(5):e790. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35522900/> DOI: 10.1002/ctm2.790
28. Kolk TN der, Wall H van der, Hogendoorn GK, Rijneveld R, Luijten S, Alewijk DCJG van, et al. Pharmacodynamic Effects of Topical Omiganan in Patients With Mild to Moderate Atopic Dermatitis in a Randomized, Placebo-

- Controlled, Phase II Trial. *Clinical and Translational Science* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Oct 17];13(5):994. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7485951/> DOI: 10.1111/cts.12792
29. Carucci L, Nocerino R, Paparo L, De Filippis F, Coppola S, Giglio V, et al. Therapeutic effects elicited by the probiotic *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG in children with atopic dermatitis. The results of the ProPAD trial. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2023 Feb 14];33(8):e13836. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36003050/> DOI: 10.1111/pai.13836
 30. Howard B, Bascom CC, Hu P, Binder RL, Fadayel G, Huggins TG, et al. Aging-Associated Changes in the Adult Human Skin Microbiome and the Host Factors that Affect Skin Microbiome Composition. *Journal of Investigative Dermatology* [Internet]. 2021 Dec 8 [cited 2022 Feb 13]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34890626/> DOI: 10.1016/j.jid.2021.11.029
 31. Emmert H, Baurecht H, Thielking F, Stölzl D, Rodriguez E, Harder I, et al. Stratum corneum lipidomics analysis reveals altered ceramide profile in atopic dermatitis patients across body sites with correlated changes in skin microbiome. *Experimental Dermatology* [Internet]. 2020 Sep 17; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32885529/> DOI: 10.1111/exd.14185
 32. Nakatsuji T, Chen TH, Narala S, Chun KA, Two AM, Yun T, et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Science Translational Medicine* [Internet]. 2017 Feb 22;9(378):eaah4680. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28228596/> DOI: 10.1126/scitranslmed.aah4680

Artigo

CINtec® PLUS NO DIAGNÓSTICO DO CANCRO DO COLO DO ÚTERO NO CENTRO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO DO ALGARVE

João Furtado^{1,2,3*}, Carolina Gregório¹, Inês Santos¹, Tatiana Mira¹, Rui Plácido Raposo^{1,2}, Ana Rita Possante¹ e Inês Gago-Rodrigues^{1,2,3}

¹ Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve (ESSUAlg)

² Centro de Estudos e Desenvolvimento em Saúde da ESSUAlg (CES)

³ Algarve Biomedical Center Research Institute (ABCRI)

* Autor correspondente: jffurtado@ualg.pt (João Furtado); Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve; Campus Gambelas – Edifício 1 – Piso 2, 8005-139 Faro, Portugal.

Resumo: O cancro do colo do útero (CCU), a nível mundial, é a quarta causa de morte por cancro na mulher representando por volta de 341.831 mortes anuais, sendo a causa mais comum a infeção persistente pelo Papiloma vírus Humano (HPV) de alto risco. As lesões citológicas \geq ASC-US são referenciadas para colposcopia, no entanto, estas lesões geralmente regredem espontaneamente e as pacientes podem estar a ser submetidas a exames e tratamentos desnecessários. Como o método CINtec® PLUS aumenta a especificidade e sensibilidade no diagnóstico, a sua utilização pode ajudar a rastrear pacientes em risco de desenvolver CCU mais efetivamente. Este estudo visa avaliar o Kit CINtec® PLUS como método complementar de diagnóstico de CCU em pacientes no Centro Hospitalar Universitário do Algarve (CHUA) e compreender a influência da vacinação em pacientes HPV positivas. Foram recolhidos dados de 205 mulheres dos 23 aos 68 anos, com Kit CINtec® PLUS no CHUA entre 2017 e 2019. Em 205 utentes, 26.3% apresentaram CINtec® PLUS positivo, enquanto 79.5% apresentaram HPV positivo. Nas citologias de ASC-US e LSIL, 48.8% pertenciam a utentes com CINtec® PLUS negativo. Nas colposcopias dessas utentes, 47.3% não demonstraram lesões e 22% apresentaram CIN I. A faixa etária dos 40-50 anos foi a mais representativa com 35.1% das utentes. Nas utentes não vacinadas 61.3% (92/150) apresentaram HPV positivo. Este estudo demonstrou o potencial para identificar pacientes que embora apresentem lesão, não estão em risco de desenvolver CCU, sugerindo que estes pacientes, normalmente referenciados para colposcopia, não necessitavam de realizar esse exame.

Palavras-chave: CINtec® PLUS; Cancro cervical; Vírus do Papiloma Humano (HPV); Teste HPV Cobas4800; Resultado citológico.

Citation: Furtado, J.; Gregório, C.; Santos, I.; Mira, T.; Raposo, RP.; Possante, AR.; Gago-Rodrigues, I. CINtec® Plus no Diagnóstico do Cancro do Cóló do Útero no Centro Hospitalar Universitário do Algarve. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2023 Mar 11;1(1):50-62

Academic Editor: Diana Martins

Received: 27 January 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 11 March 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Science

1. Introdução

A nível mundial, CCU representa o quarto tipo de neoplasia mais comum em mulheres e é uma das principais causas de morte por cancro no sexo feminino em países em desenvolvimento, possuindo uma incidência de 13,1/100.000 habitantes e uma taxa de mortalidade de 6,9/100.000 habitantes(1,2). Em Portugal, representa o quinto tipo de neoplasia mais comum em mulheres, com uma incidência de 8,9/100.000 habitantes e uma taxa de mortalidade de 2,8/100.000 habitantes(2).

O HPV é um vírus sexualmente transmissível, com mais de 200 genótipos identificados, estando cerca de 40 envolvidos na área genital, classificados consoante o seu potencial oncogénico em genótipos de baixo e alto risco. Têm sido apontadas diversas causas etiológicas para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia, no entanto aproximadamente 95% das lesões malignas cervicais resultam da infeção persistente pelo HPV de alto risco (HR-HPV), relacionados maioritariamente com HPV16 e 18(3). O número de parceiros sexuais é um dos fatores diretamente relacionados com a infeção por HPV, sendo que o risco de infeção aumenta em indivíduos com um elevado número de parceiros. Para além da infeção por HPV, o CCU está relacionado com outros fatores de risco como o tabaco(4).

A vacinação contra a infeção por HPV em Portugal iniciou em 2008 em raparigas com 13 anos, com a vacina tetravalente, contra HPV 6, 11, 16 e 18, passando a estar integrada no plano

nacional de vacinação(5,6). Atualmente é utilizada uma vacina contra nove genótipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) que deve ser iniciada em raparigas aos 10 anos de idade, sendo aplicável também ao sexo masculino, se nascidos ≥ 2009 , e deve ser terminada antes dos 27 anos de idade(7).

Atualmente, em Portugal, o rastreio para o CCU é realizado em mulheres com idade igual ou superior a 25 anos e igual ou inferior a 60 anos, sendo repetido de 5 em 5 anos quando os resultados são negativos(8). Inicialmente, o teste primário utilizado para este rastreio era a citologia ginecológica, no entanto, atualmente realiza-se primariamente o teste de HR-HPV (HPV16/18 e outros 12 serótipos de alto risco), que apresenta uma maior sensibilidade(8,9). As mulheres que testem positivo para HPV16/18 são encaminhadas para colposcopia, enquanto que em casos das mulheres positivas para outros HR-HPV é realizada uma citologia, que dando positiva para alterações iguais ou superiores a células atípicas pavimentosas de significado indeterminado (ASC-US), a paciente é referenciada para realizar diagnóstico por colposcopia(8). Este exame permite classificar histologicamente as lesões de acordo com as anormalidades a nível celular consequentes da infeção viral. Desta forma é possível avaliar a gravidade da neoplasia intraepitelial cervical (CIN), na qual CIN I representa um marcador histológico clinicamente insignificante de infeção por HPV e os CIN II e III são considerados lesões de alto grau. O CIN III pode ser considerado uma lesão pré-cancerígena, no entanto a sua regressão é possível(10).

O ASC-US e a lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) são as alterações mais detetadas aquando da realização do rastreio cervical. Embora estas normalmente regridam espontaneamente, apenas uma pequena fração de mulheres com citologia ASC-US e LSIL irá progredir para uma lesão intraepitelial de alto grau (HSIL). Consequentemente, são encaminhadas para a realização de exames como a colposcopia e biópsias, que podem alargar-se por um longo período. Estas práticas levam à execução de tratamentos excessivos e aumento de custos de diagnóstico em utentes com um risco muito baixo de poder vir a desenvolver CCU, causando muitas vezes efeitos negativos para a saúde, como ansiedade(11). Deste modo, uma estratégia de triagem de ASC-US e LSIL eficaz permitiria a distinção entre mulheres que precisam efetivamente de realizar mais testes de diagnóstico, como colposcopia, daquelas que poderiam retornar com segurança para o rastreio de rotina(12,13).

Tendo isto em conta, o CINtec® PLUS surgiu como um teste complementar eficiente que pode ser utilizado no rastreio do CCU e auxiliar na triagem destas lesões (ASC-US e LSIL). Este teste utiliza a técnica de imunocitoquímica com dupla marcação, que deteta simultaneamente as proteínas p16 e Ki-67 expressas em excesso nas células cervicais infetadas por HPV integrado no genoma, ou seja, a dupla positividade do kit de citologia CINtec® PLUS indica atividade oncogénica (14,15). Embora os métodos moleculares de deteção de HPV não diferenciem infeções transitórias de infeções persistentes, a utilidade clínica do kit é alta, o que contribui para a avaliação de risco de CIN II+ evitando colposcopias desnecessárias (16,17).

O presente estudo pretende avaliar a contribuição do CINtec® PLUS como meio complementar no diagnóstico do CCU no CHUA, nomeadamente, a sua capacidade em agregar informações à prática clínica no rastreamento e acompanhamento de lesões cervicais. Pretendendo-se com o mesmo contribuir com informação válida que permita fundamentar uma eventual alteração de procedimentos de diagnóstico de CCU e desta forma evitar a realização de exames de diagnóstico desnecessários, como colposcopia e biópsia, que consequentemente levam à execução de tratamentos excessivos e ansiedade por parte das utentes.

2. Materiais e Métodos

O presente estudo consiste num estudo observacional retrospectivo, onde os dados foram recolhidos com a conveniência do Serviço de Anatomia Patológica do CHUA. Foram recolhidos 212 dados relativos à população feminina do Algarve, com uma idade compreendida entre os 23 e 68 anos, que realizou o exame CINtec® PLUS entre os anos 2017 a 2019.

Os critérios de inclusão são: Indivíduos do sexo feminino com uma idade de 23 anos ou mais; admitidas à realização do teste complementar CINtec® PLUS em conjunto com citologia cervical e tipagem de HPV-HR e sujeitas a colposcopia. Os critérios de exclusão são: Indivíduos do sexo feminino com uma idade abaixo dos 23 anos e acima dos 69 anos (a idade foi caracterizada de 10 em 10 anos); sem dados de tipagem HPV, com antecedentes de tratamento excecional ou destrutivo do colo ou da vagina; e histerectomia total. As variáveis em estudo: resultado da citologia cervical (negativa, ASC-US, LSIL, HSIL, ASC-H e AGC); resultado de CINtec® PLUS (positivo, negativo e insatisfatório); tipagem de HPV (negativo, HPV16, HPV18 e outros HR-HPV); vacinação contra

HPV (sim ou não); hábitos tabágicos (fumadora, ex-fumadora e não fumadora); faixa etária (agrupada de 10 em 10 anos); número de parceiros sexuais (agrupado em 1 parceiro, entre 1 e 5 parceiros e > 5 parceiros) e achados colposcópicos (sem lesão; CIN I; CIN II/III).

Para a produção dos dados provenientes do kit CINtec® PLUS, foram efetuadas lâminas no processador ThinPrep® (Hologic) e a dupla marcação foi elaborada consoante o protocolo de referência do comerciante no sistema BenchMark ULTRA (Ventana-Roche)(18).

O teste de HPV foi realizado utilizando o sistema cobas® 4800, de acordo com as instruções do comerciante. Os resultados HPV foram avaliados como positivo ou negativo para HR-HPV e a tipagem foi avaliada relativamente à positividade para os genótipos 16/18, e/ou para os outros 12 genótipos de alto risco(19).

Na citologia cervical, o material foi colhido e processado no ThinPrep® 2000 Processor (CYTYC), corado com Papanicolaou e observado por um citotécnico(20). Os resultados foram dados como citologia negativa para lesões intraepiteliais (NILM), ASC-US, LSIL, ASC-H, HSIL, e células glandulares atípicas (AGC). A variável “achados colposcópicos” foi caracterizada como sem lesão; CIN I; CIN II/III; sem informação, de acordo com a interpretação dos resultados obtidos no exame.

A análise estatística foi realizada através da utilização do IBM SPSS® v26 e Microsoft Excel®. Os dados obtidos foram analisados através de estatística descritiva e inferencial para testar relações de dependência estatisticamente significativas entre as variáveis em estudo. Foi aplicado o teste qui-quadrado para avaliar a relação entre variáveis nominais, com 95% de intervalo de confiança e significância estatística definida como valor de $p < 0,05$.

3. Resultados

Os dados demonstrados provêm de uma análise retrospectiva dos resultados do teste de CINtec® PLUS, tipagem HPV, citologia cervical e achados colposcópicos, recolhidos no laboratório de Anatomia Patológica do CHUA de utentes do Algarve. As amostras são referentes aos anos de 2017 a 2019, obtendo-se assim um total de 212 resultados ($n=212$).

3.1. Distribuição dos resultados de CINtec® PLUS, tipagem HPV e citologia cervical

Numa amostra de 212 utentes com resultado de CINtec® PLUS, foram excluídas 7 utentes devido à ausência de resultado do teste de HPV, resultando numa amostra de 205 utentes com todos os critérios de inclusão (Figura 1). Desta amostragem, 5,4% encontram-se entre os 20 e os 30 anos, 2,2% entre os 30 e os 40 anos, 35,1% entre os 40 e os 50 anos, 18,5% entre os 50 e os 60 anos e 8,8% entre os 60 e os 70 anos.

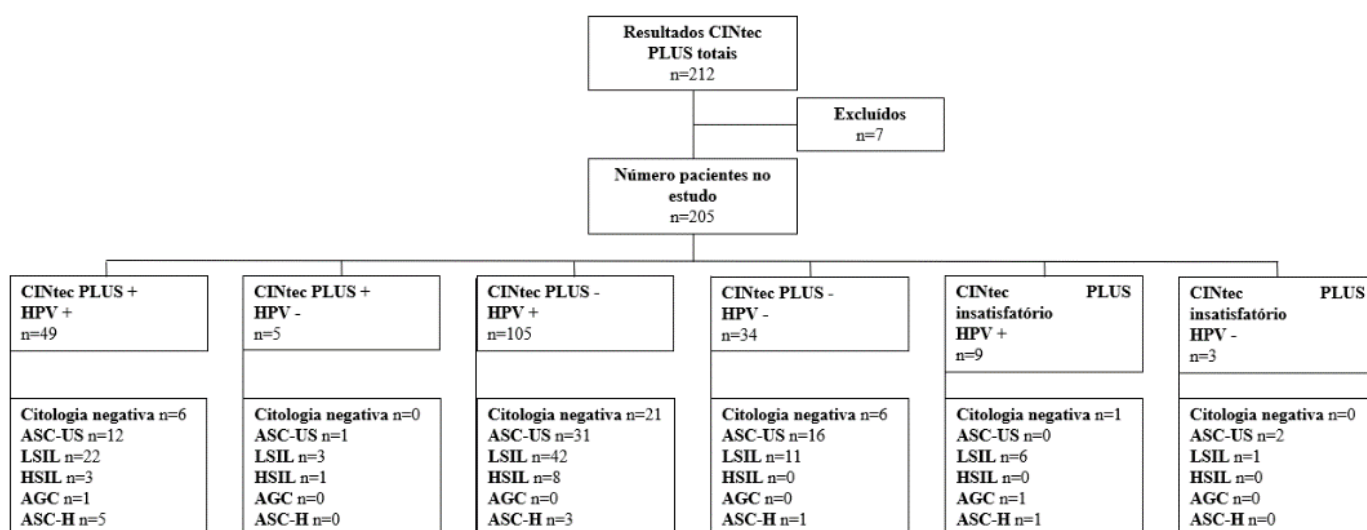


Figura 1. Distribuição dos resultados de CINtec® PLUS, tipagem HPV e citologia cervical na amostra.

O CINtec® PLUS foi positivo em 26,3% das utentes e negativo em 67,8% das utentes (Figura 2). Na tipagem HPV, 20,5% das utentes eram negativas e 79,5% positivas (Figura 3). A maioria das utentes positivas para infeção por HPV demonstraram positividade para os outros 12 genótipos

de alto risco (58%), enquanto 12,7% apresentaram-se positivas para HPV16, 4,9% positivas para HPV18 e 0,5% positivas para ambos (Figura 3).

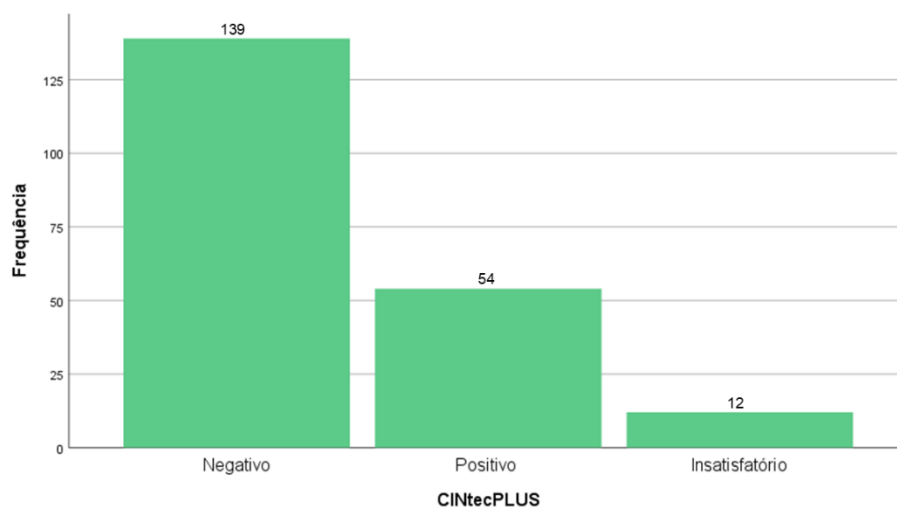


Figura 2. Frequências e percentagens do CINtec® PLUS. Negativo (139/67,8%), Positivo (54/26,3%) e Insatisfatório (12/5,9%).

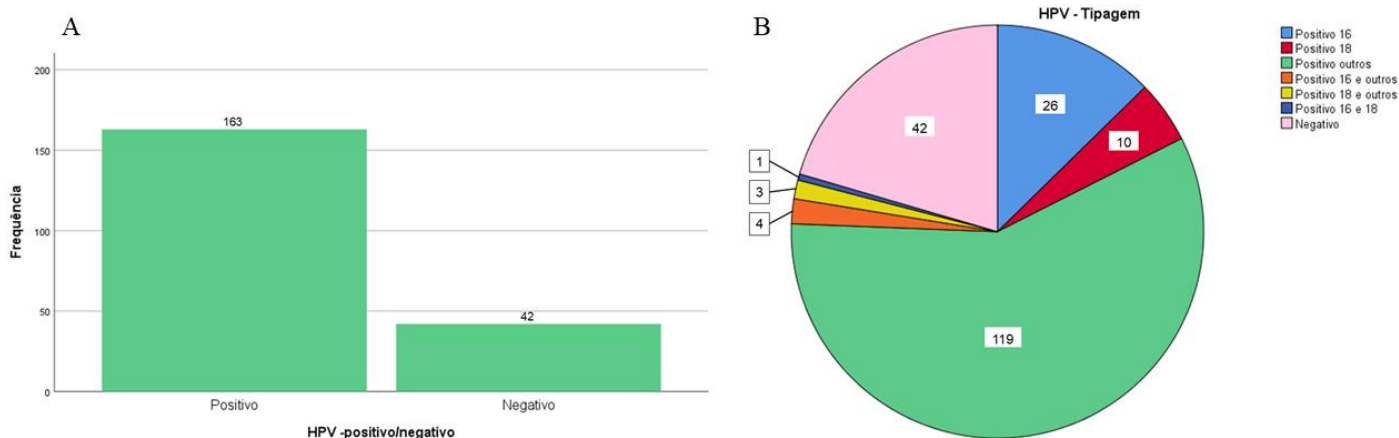


Figura 3. (A) Frequências e percentagens do resultado HPV (positivo/negativo): Positivo (163/79,5%) e Negativo (42/20,5%). (B) Frequências e percentagens da tipagem HPV: Positivo 16 (26/12,7%), Positivo 18 (10/4,9%), Positivo outros (119/58%), Positivo 16 e outros (4/2%), Positivo 18 e outros (3/1,5%), Positivo 16 e 18 (1/0,5%) e Negativo (42/20,5%).

3.2. Frequências dos resultados da citologia cervical, achados colposcópicos, tabagismo e número de parceiros sexuais

Relativamente à citologia cervical, a maioria das utentes apresentou um resultado de LSIL (41,5%), ASC-US (29,5%) ou negativo (16,6%). Nos achados colposcópicos observou-se uma predominância de utentes sem lesões (65,9%) e, relativamente às lesões, a mais comum foi o CIN I (28,8%). Em ambas as variáveis, os restantes resultados não apresentaram elevada representatividade (Figura 4).

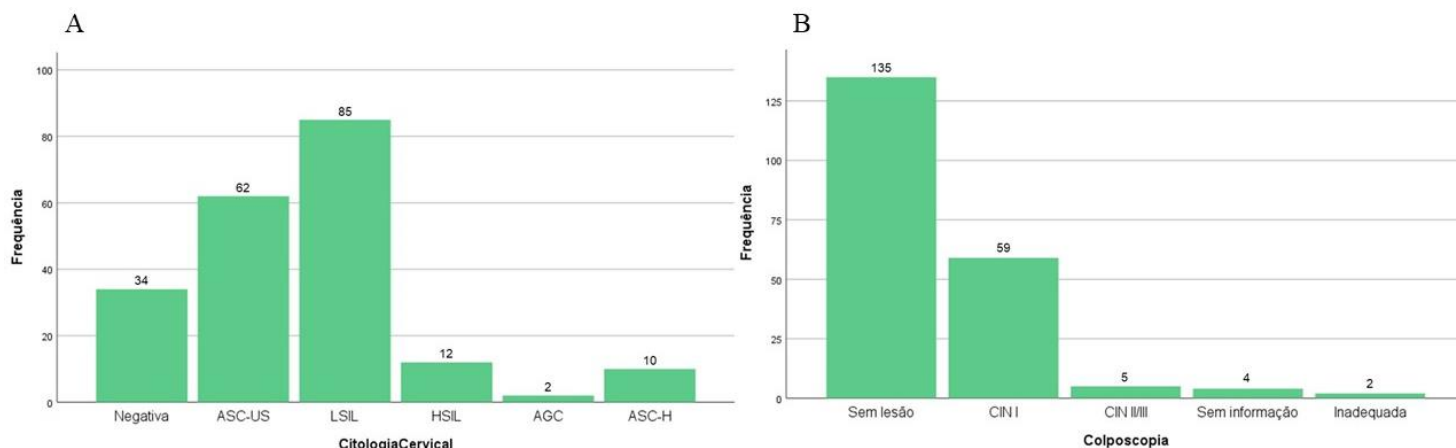


Figura 4. (A) Frequências e percentagens da citologia cervical: Negativa (34/16,6%), ASC-US (62/30,2%), LSIL (85/41,5%), HSIL (12/5,9%), AGC (2/1%) e ASC-H (10/4,9%). (B) Frequências e percentagens dos achados colposcópicos: Sem lesão (135/65,9%), CIN I (59/28,8%), CIN II (5/2,4%), sem informação (4/2%) e inadequada (2/1%).

A maioria das utentes demonstraram não ser fumadoras (42,9%), no entanto 33,6% admitiram ter hábitos tabágicos. Quanto ao número de parceiros sexuais, 49,8% das utentes relataram ter entre 1 e 5 parceiros, 9,8% relataram ter > 5 parceiros, enquanto 8,3% tiveram apenas 1 parceiro durante a vida.

3.3. Associação estatística entre variáveis

Procedeu-se à avaliação das associações entre as variáveis CINtec® PLUS e citologia cervical, resultado HPV, tipagem HPV e idade; entre citologia cervical e achados colposcópicos; entre a vacina (sim/não) e resultado HPV, idade e tipagem HPV; e, por fim, entre resultado CINtec® PLUS, tabagismo e número de parceiros sexuais, recorrendo à realização do teste Qui-Quadrado (Tabela 1).

Tabela 1. Associações entre as variáveis. (Significância estatística como valor de $p < 0,05$).

Variáveis	Valor de p	Nível de Significância de Relação
CINtec PLUS x Citologia cervical	0,046	Associação significativa
CINtec PLUS x Resultado HPV	0,059	Sem associação
CINtec PLUS x Tipagem HPV	0,046	Associação significativa
CINtec PLUS x Idade	0,085	Sem associação
Citologia cervical x Achados colposcópicos	0,548	Sem associação
Vacina (sim/não) x Resultado HPV	0,025	Associação significativa
Vacina (sim/não) x Idade	<0,01	Associação significativa
Vacina (sim/não) x Tipagem HPV	0,198	Sem associação
Tabagismo x CINtec PLUS	0,048	Associação significativa
Nº parceiros sexuais c CINtec PLUS	0,413	Sem associação

3.4. Associação entre CINtec® PLUS, Citologia Cervical e Idade

Na associação entre CINtec® PLUS e citologia cervical ($p=0,046$) observa-se que nos resultados de citologias negativas, ASC-US e LSIL há uma maior predominância de resultados CINtec® PLUS negativos, enquanto nos resultados do tipo ASC-H verifica-se uma maior predominância de resultados CINtec® PLUS positivos (Figura 5).

Relativamente à idade, verifica-se que em todas as faixas etárias houve uma maior proporção de resultados CINtec® PLUS negativos em relação aos positivos ($p=0,085$). No entanto, observa-se que entre os 30 e os 50 anos existe uma maior positividade de CINtec® PLUS em comparação com as restantes idades (Figura 5).

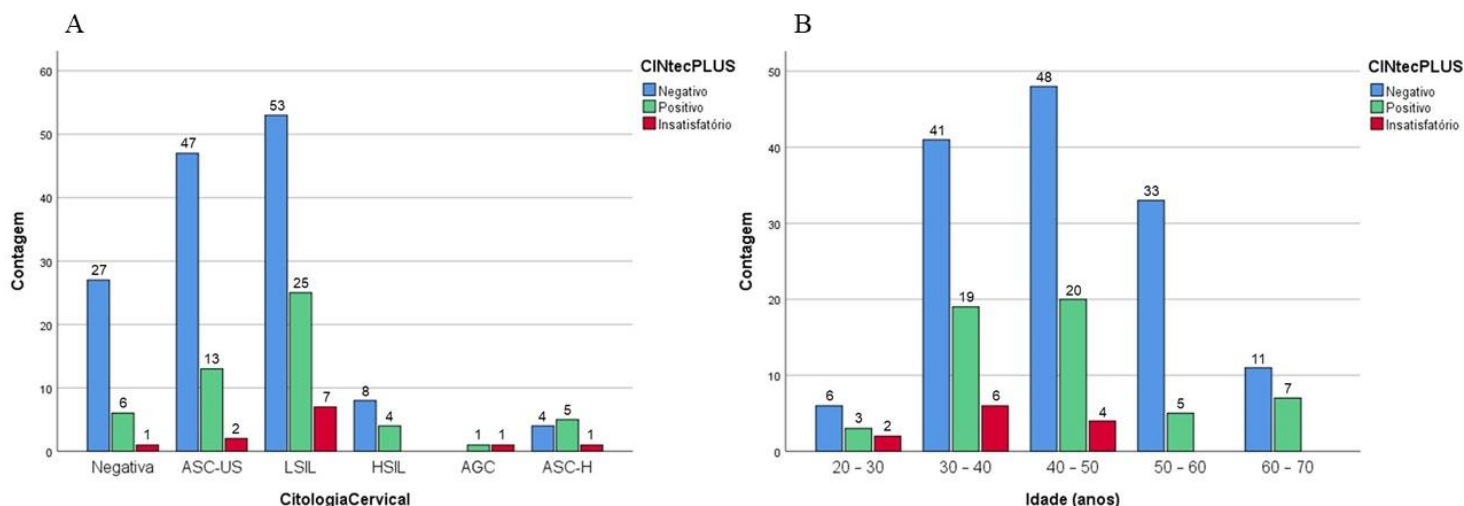


Figura 5. (A) Associação de CINtec® PLUS com citologia cervical: Citologias negativas (n=34): CINtec® PLUS negativo (27/79,4%), CINtec® PLUS positivo (6/17,6%) e CINtec® PLUS insatisfatório (1/3%). ASC-US (n=62): CINtec® PLUS negativo (47/75,8%), CINtec® PLUS positivo (13/21%) e CINtec® PLUS insatisfatório (2/3,2%). LSIL (n=85): CINtec® PLUS negativo (53/62,4%), CINtec® PLUS positivo (25/29,4%) e CINtec® PLUS insatisfatório (7/8,2%). HSIL (n=12): CINtec® PLUS negativo (8/66,7%) e CINtec® PLUS positivo (4/33,3%). AGC (n=2): CINtec® PLUS positivo (1/50%) e CINtec® PLUS insatisfatório (1/50%). ASC-H (n=10): CINtec® PLUS negativo (4/40%), CINtec® PLUS positivo (5/50%) e CINtec® PLUS insatisfatório (1/10%). (B) Associação de CINtec® PLUS com idade: 20-30 anos (n=11): CINtec® PLUS negativo (6/54,5%), CINtec® PLUS positivo (3/27,3%) e CINtec® PLUS insatisfatório (2/18,2%). 30-40 anos (n=66): CINtec® PLUS negativo (41/62,1%), CINtec® PLUS positivo (19/28,8%) e CINtec® PLUS insatisfatório (6/9,1%). 40-50 anos (n=72): CINtec® PLUS negativo (48/66,7%), CINtec® PLUS positivo (20/27,8%) e CINtec® PLUS insatisfatório (4/5,6%). 50-60 anos (n=38): CINtec® PLUS negativo (33/86,8%) e CINtec® PLUS positivo (5/13,2%). 60-70 anos (n=18): CINtec® PLUS negativo (11/61,1%) e CINtec® PLUS positivo (7/38,9%).

3.5. Associação entre CINtec® PLUS e resultado HPV

Na associação entre CINtec® PLUS e resultado de HPV, tanto nos casos de CINtec® PLUS negativos como positivos existe uma maior predominância de utentes com resultados positivos de HPV ($p=0,059$) (Figura 6). Ao analisar a relação entre o CINtec® PLUS e a tipagem HPV observa-se que, tanto para os resultados positivos como negativos de CINtec® PLUS, o genótipo mais comum são outros HR-HPV (Figura 6). Nos resultados negativos de CINtec® PLUS observa-se uma elevada proporção de resultados negativos de HPV, mas também uma quantidade relativa de resultados positivos para HPV16 ($p=0,046$) (Figura 6).

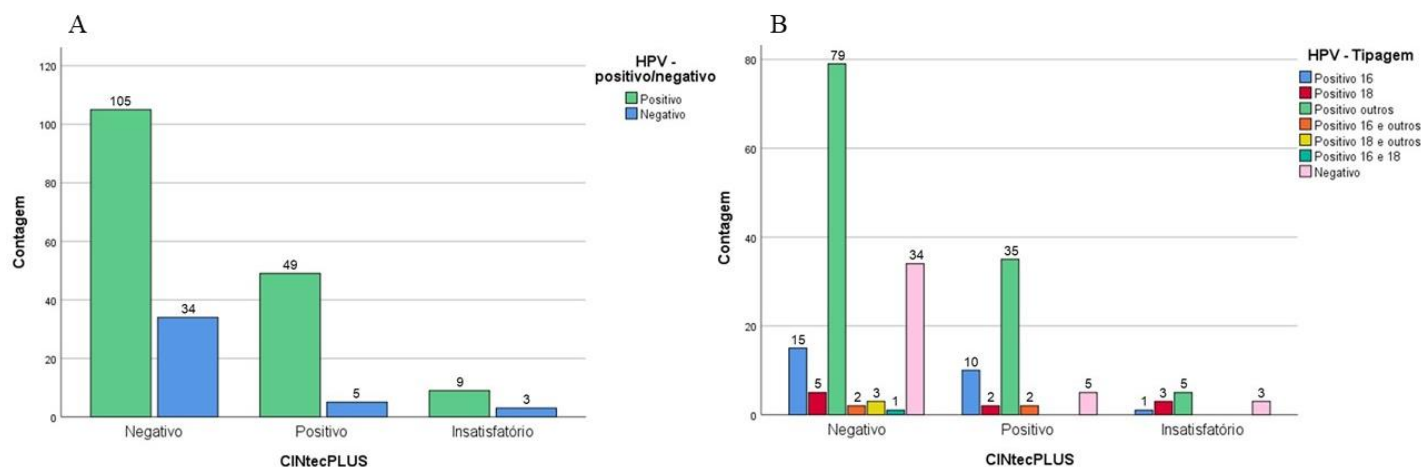


Figura 6. (A) Associação de CINtec® PLUS com HPV (pos/neg): CINtec® PLUS negativo (n=139): HPV Positivo (105/75,5%) e HPV Negativo (34/24,5%). CINtec® PLUS positivo (n=54): HPV Positivo (49/90,7%) e HPV Negativo (5/9,3%). CINtec® PLUS insatisfatório (n=12): HPV Positivo (9/75%) e HPV Negativo (3/25%) **(B)** Associação de CINtec® PLUS com tipagem HPV: CINtec® PLUS negativos: HPV16 (15/10,8%), HPV18 (5/3,6%), outros HR-HPV (79/56,8%), HPV16 e outros (2/1,4%), HPV18 e outros (3/2,2%), HPV 16 e 18 (1/0,7%) e Negativo (34/24,5%). CINtec® PLUS positivos: HPV16 (10/18,5%), HPV18 (2/3,7%), outros HR-HPV (35/64,8%), HPV16 e outros (2/3,7%) e Negativo (5/9,3%). CINtec® PLUS insatisfatório: HPV16 (1/8,3%), HPV18 (3/25%), outros HR-HPV (5/41,7%) e Negativo (3/25%).

3.6. Associação entre Citologia Cervical e Achados Colposcópicos

As variáveis citologia cervical e achados colposcópicos não revelaram associação estatisticamente significativa entre si ($p=0,548$). Em todos os resultados de citologia as utentes demonstram principalmente colposcopias sem lesões ou com lesões CIN I (Figura 7).

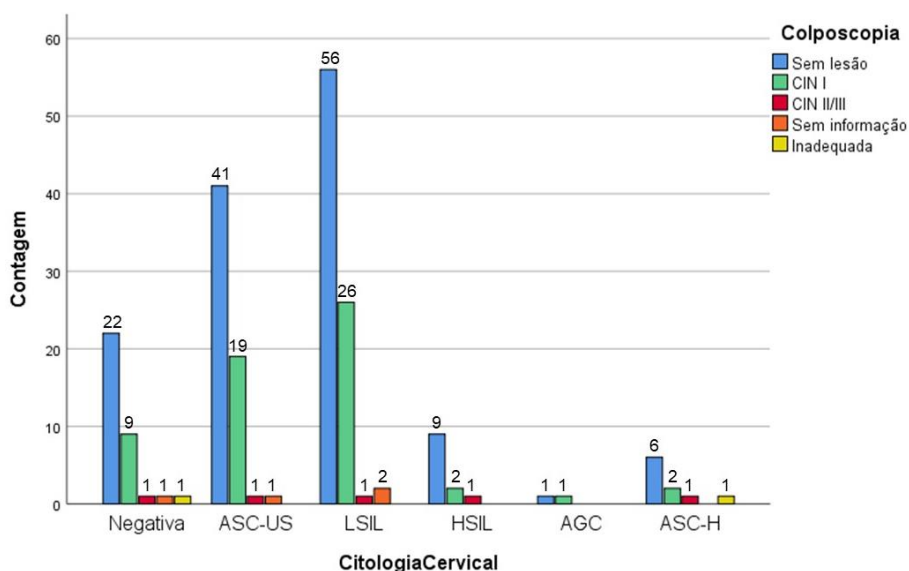


Figura 7. Associação entre citologia cervical e achados colposcópicos. Citologias negativas (n=34): Sem lesão (22/64,7%), CIN I (9/26,5%), CIN II (1/2,9%), sem informação (1/2,9%) e inadequada (1/2,9%). ASC-US (n=62): Sem lesão (41/66,1%), CIN I (19/30,6%), CIN II (1/1,6%) e sem informação (1/1,6%). LSIL (n=85): Sem lesão (56/65,9%), CIN I (26/30,6%), CIN II (1/1,2%) e sem informação (2/2,4%). HSIL (n=12): Sem lesão (9/75%), CIN I (2/16,6%) e CIN II (1/8,3%). AGC (n=2): Sem lesão (1/50%) e CIN I (1/50%). ASC-H (n=10): Sem lesão (6/60%), CIN I (2/20%), CIN II (1/10%) e inadequada (1/10%).

3.7. Associação entre Vacinação, HPV e Idade

Devido ao elevado número de utentes sem informação relativamente à vacinação e/ou quando foi vacinada, nas análises destas variáveis inclui-se apenas a amostra com dados avaliáveis (n=150). Relativamente à vacinação e à idade foi verificada associação estatisticamente significativa com o resultado HPV ($p=0,025$ e $p<0,01$).

Em relação à vacinação foi verificado que a maioria das utentes não são vacinadas e que a faixa etária mais vacinada é entre os 30 e 40 anos, ao contrário das idades mais avançadas que apresentam uma baixa proporção de utentes vacinadas. Também se observou que a maioria das utentes positivas para infeção por HPV não se encontram vacinadas (Tabela II).

Tabela 2. Distribuição da variável vacinação (sim/não) com o resultado de HPV (positivo/negativo) e a idade.

Vacina	HPV	Idade (anos)					Total
		[20 – 30[[30 – 40[[40 – 50[[50 – 60[[60 – 70[
Sim	Positivo	3	11	3	1	0	18
	Negativo	0	5	3	0	0	8
Não	Positivo	5	35	39	22	7	108
	Negativo	2	4	7	1	2	16
Total		10	55	52	24	9	150

Não foi verificada uma relação estatisticamente significativa entre a tipagem HPV e a vacinação ($p=0,198$). As utentes positivas para outros genótipos de HR-HPV representam a maioria tanto no grupo vacinado antes ou depois da infeção como no grupo nunca vacinado. O genótipo HPV16 apresenta uma proporção elevada no grupo de utentes nunca vacinadas em comparação com os restantes grupos (Figura 8).

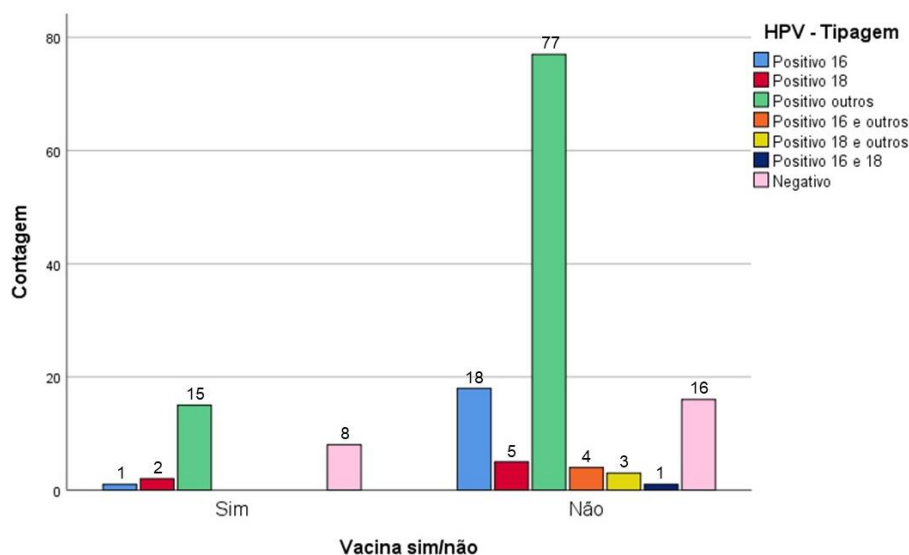


Figura 8. Associação entre vacinação (sim/não) e tipagem HPV. Vacinadas (n=26): HPV16 (1/3,8%), HPV18 (2/7,7%), outros HR-HPV (15/57,7%) e Negativo (8/30,8%). Não vacinadas (n=124): HPV16 (18/14,5%), HPV18 (5/4%), outros HR-HPV (77/62,1%), HPV16 e outros (4/3,2%), HPV18 e outros (3/2,4%), HPV16 e HPV18 (1/0,8%) e Negativo (16/12,9%).

Foi observada uma associação estatisticamente significativa entre o resultado CINTec® PLUS e o tabagismo ($p=0,048$). Não foi observada uma elevada diferença na proporção de utentes positivas para CINTec® PLUS fumadoras e não fumadoras, assim como nas utentes com resultado negativo (Figura 9). Relativamente às variáveis CINTec® PLUS e número de parceiros sexuais, tanto as utentes com resultado positivo como negativo neste teste demonstraram ter principalmente entre 1 e 5 parceiros sexuais durante a vida, à exceção das utentes sem informação relativamente a esta variável ($p=0,413$) (Figura 9).

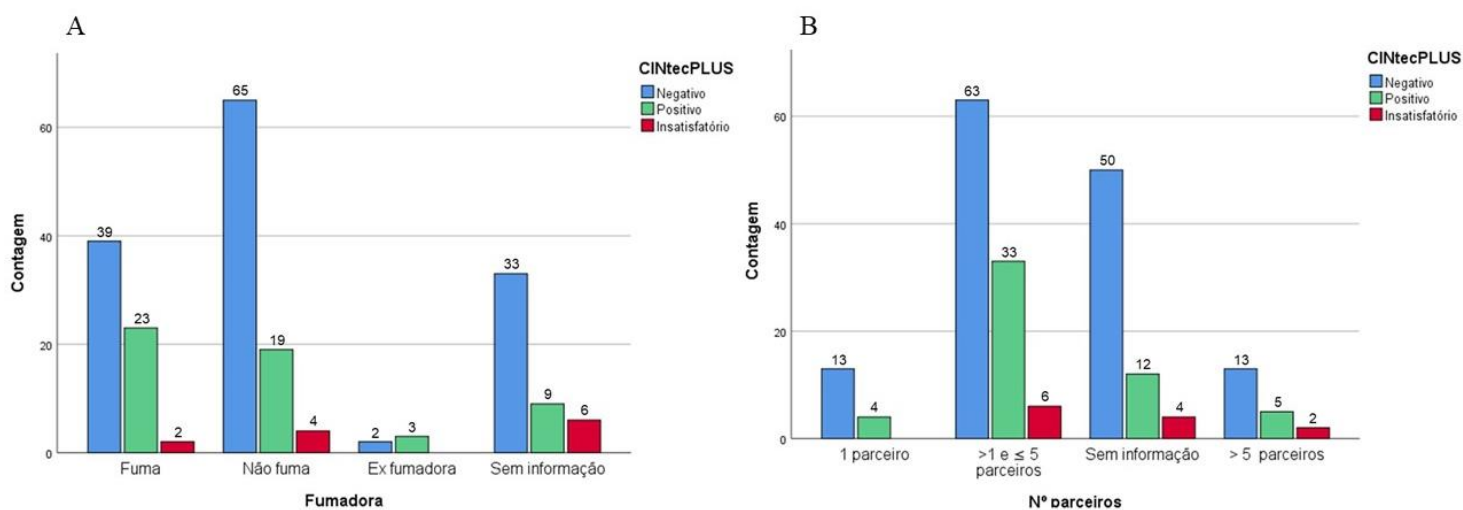


Figura 9. (A) Associação da variável CINtec® PLUS com hábitos tabágicos: Fumadoras (n=64): CINtec® PLUS negativo (39/60,9%), CINtec® PLUS positivo (23/35,9%) e CINtec® PLUS insatisfatório (2/3,1%). Não fumadoras (n=88): CINtec® PLUS negativo (65/73,9%), CINtec® PLUS positivo (19/21,6%) e CINtec® PLUS insatisfatório (4/4,5%). Ex-fumadoras (n=5): CINtec® PLUS negativo (2/40%) e CINtec® PLUS positivo (3/60%). (B) Associação da variável CINtec® PLUS com número de parceiros sexuais: 1 parceiro (=17): CINtec® PLUS negativo (13/76,5%) e CINtec® PLUS positivo (4/23,5%). >1 e ≥5 parceiros (n=102): CINtec® PLUS negativo (63/61,8%), CINtec® PLUS positivo (33/32,4%) e CINtec® PLUS insatisfatório (6/5,9%). >5 parceiros (n=20): CINtec® PLUS negativo (13/65%), CINtec® PLUS positivo (5/25%) e CINtec® PLUS insatisfatório (2/10%).

4. Discussão

Como relatado em estudos anteriores sobre a aplicabilidade do CINtec® PLUS, observou-se que este teste é principalmente aplicado em mulheres com idades acima dos 30 anos(21–23).

Na análise de resultados de CINtec® PLUS e do teste molecular de HPV, o nosso estudo demonstrou uma maior positividade no teste HPV (79,5%) em comparação com a positividade de CINtec® PLUS (26,3%). Demonstrou-se também que a maioria das utentes tinham um resultado positivo na tipagem HPV, mas posteriormente tinham um resultado negativo no CINtec® PLUS, sendo que apenas 23,9% dos casos eram positivos para ambos. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de que o CINtec® PLUS detetar células em verdadeira transformação oncótica, enquanto o teste HPV cobas4800 deteta o DNA de HR-HPV, não diferenciando entre o vírus na sua fase ativa e latente, ou seja, tanto identifica infeções HPV persistentes como infeções transitórias que não progridem para neoplasia cervical de alto grau(18,24,25).

Na citologia cervical, as lesões mais frequentemente encontradas foram ASC-US e LSIL e, como foi referido anteriormente, estas são as lesões mais comumente encontradas na realização do rastreio cervical(13). Para além disso, observou-se que a maioria das utentes com este tipo de lesões na citologia cervical obtiveram um resultado negativo no CINtec® PLUS. Tendo em conta que as lesões ASC-US e LSIL normalmente regredem espontaneamente, estes achados contribuem para a hipótese de utilizar CINtec® PLUS na triagem de utentes em risco(21). No caso da lesão ASC-H, que pode sugerir a presença de uma lesão de alto grau, existem mais casos CINtec® PLUS positivos do que negativos. No entanto na lesão de alto grau HSIL isso não se observa, o que pode corroborar o facto de que estas lesões também têm a capacidade de regredir(26).

À semelhança do um estudo realizado por Sousa, et al em 2019, sobre a distribuição dos genótipos de HR-HPV na região norte de Portugal, observou-se que os genótipos mais comuns na nossa amostra foram os outros 12 HR-HPV, o que era esperado pois abrange um maior número de genótipos diferentes(27). Comparando mais especificamente os genótipos 16 e 18, verifica-se que no nosso todo o HPV16 apresentou uma percentagem de 14,5% e o HPV18 uma percentagem de 4%, mostrando-se semelhantes ao que foi observado por Sousa, et al, que apresentou uma percentagem de 17,5% para HPV16 e 5,12% para HPV18(27). Importante referir que estas percentagens se referem à população não vacinada da nossa amostra, pois na população vacinada não é esperado encontrar utentes com HPV16/18, ou apenas em percentagens não representativas.

Observou-se que a maioria das utentes com outros HR-HPV, e que, portanto, são referenciadas para colposcopia caso obtenham achados citológicos ≥ ASC-US, demonstraram ter um

resultado negativo no CINtec® PLUS, o que sugere que essas utentes poderiam voltar ao rastreio normal. É também possível observar-se a maioria das utentes positivas para HPV16/18, que normalmente são referidas diretamente para colposcopia, também tiveram um resultado negativo de CINtec® PLUS(8), demonstrando que este teste tem potencial para melhorar a taxa de deteção de lesões na colposcopia e a sua associação com a genotipagem parcial pode promover a redução na proporção de colposcopias, sendo suportado por vários estudos como por exemplo o Stoler et al, que demonstra que a única estratégia com maior sensibilidade sem perda de especificidade foi: HPV16/18+ ou 12 outros HR-HPV+ com p16/Ki-67+ (27).

Ao cruzarmos o resultado da citologia cervical com os achados colposcópicos, observa-se que a maioria das citologias realizadas apresentam também um diagnóstico colposcópico sem lesão e somente 2,4% das citologias realizadas têm diagnóstico CIN II/III, na colposcopia. Na lesão citológica com maior representatividade, a LSIL, estas utentes demonstram ter principalmente colposcopias sem lesão ou com CIN I, que é um lesão de baixo grau(10). Estes achados permitem corroborar a hipótese de que uma grande percentagem de mulheres referenciadas para colposcopia não apresentavam risco de desenvolver CCU(10).

Relativamente aos dados da vacinação, observou-se que a maioria das utentes da amostra não são vacinadas contra a infeção por HPV. Estes achados eram esperados pois, tendo em conta que a vacinação teve início em 2008 em Portugal para raparigas com 13 anos e o intervalo de idades mais prevalente na nossa amostra é dos 30 aos 50 anos, a maioria destas mulheres não foram incluídas no plano de vacinação contra o HPV(7). Observou-se que a maioria das utentes positivas para infeção por HR-HPV não eram vacinadas, no entanto, 16,6% das utentes demonstraram ser vacinadas e positivas para HPV. Este resultado pode ser explicado pelo facto de que estas utentes foram infetadas por outros genótipos de HR-HPV, não abrangidos pela vacina tetravalente. Podemos ainda observar que, na população não vacinada da nossa amostra, o HPV16/18 abrangido pela vacina tetravalente está presente em apenas 19,4% das utentes, e 67,7% das utentes estão infetadas por genótipos que não são abrangidos por essa vacina. Isto permite realçar a importância de ter surgido uma vacina mais abrangente como a vacina nonavalente utilizada atualmente. Para além disso, como demonstrado no estudo sobre genotipagem de HPV no norte de Portugal, ainda existem genótipos não abrangidos na vacina nonavalente, sendo importante o desenvolvimento de novas vacinas(28).

Verificou-se que dentro do grupo de utentes vacinadas, 69,2% encontram-se infetadas com HR-HPV, no entanto, 57,7% destas são positivas para os outros 12 HR-HPV. Isto era expectável pois estas pacientes foram vacinadas com a vacina tetravalente que apenas abrange o HPV16/18(6). Nas utentes vacinadas, 3,8% são positivas para HPV16 e 7,7% são positivas para HPV18. Isto pode ser explicado pelo facto de que ainda que a vacina tetravalente abranja estes genótipos, a vacinação não é 100% eficaz e é possível que estas utentes tenham contraído infeção por estes genótipos. Para além disso, ao analisarmos os resultados de CINtec® PLUS destas utentes, conclui-se que todos são negativos, ou seja, apesar de estarem infetadas por HPV, o vírus não integrou o genoma, que pode ser consequência de uma resposta por parte do sistema imunitário destas pacientes imunizadas. Apesar destes achados, pôde-se observar uma diminuição nos casos de HPV16/18 nas utentes vacinadas em comparação com as utentes não vacinadas, o que contribui também para eficácia da vacinação(29).

Relativamente à influência do tabagismo nos resultados CINtec® PLUS, tendo em conta que as mulheres fumadoras estão em maior risco de desenvolver CCU, seria esperado que estas tivessem uma maior percentagem de resultados positivos para CINtec® PLUS(30). Este resultado comprova-se, no entanto, a diferença com as utentes não fumadoras não é significativamente elevada para referir que existe uma influência do tabaco nas utentes da amostra. Relativamente ao número de parceiros sexuais, este é um dos fatores que está associado ao aumento do risco de infeção por HPV(4). No entanto, ao compararmos o grupo de utentes com apenas 1 parceiro com o grupo com >5 parceiros, podemos observar que não existem diferenças significativas relativamente aos resultados do CINtec® PLUS, sugerindo que este fator também não apresenta influência nesta amostra de utentes. De salientar que apenas 73,1% (150/205) da amostra possuía informações sobre estes fatores nos registos médicos (n=150), podendo existir algum estigma social que impeça a divulgação destas informações por parte das utentes.

É importante referir que neste estudo não foi possível analisar a sensibilidade e especificidade do teste CINtec® PLUS devido à inexistência de resultados de biópsias que permitissem realizar a comparação. Este passo seria uma das perspetivas futuras neste estudo de forma a ser possível reforçar a importância dos resultados obtidos relativamente a este teste.

5. Conclusões

O CINtec PLUS demonstra ter potencial para melhorar a taxa de deteção de lesões na colposcopia e a sua associação com a genotipagem parcial pode potenciar a redução na proporção de colposcopias. No entanto, o uso do CINtec PLUS tem um custo associado, tal como a colposcopia. Custo que deve ser comparado com a diminuição do número de colposcopias, bem como o desconforto, biopsias desnecessárias e tempo associado às mesmas.

Relativamente à vacinação, verificou-se uma influência nos resultados HPV das utentes, podendo concluir que é uma estratégia vantajosa na prevenção da infeção por este vírus, que é a principal causa etiológica para a maioria dos CCU, inclusive o CINtec® PLUS em populações vacinadas oferece uma avaliação independente do genótipo e com indicação de infeção persistente, pois a epidemiologia dos genótipos poderá sofrer alterações. Verificou-se também a importância da substituição da vacina tetravalente pela nonavalente, que para além dos HPV16/18 também confere proteção contra mais HR-HPV. Ainda assim, existem genótipos não abrangidos por esta vacina, o que realça a importância da constante avaliação das políticas de vacinação contra o HPV em Portugal.

Por fim, no futuro, o CINtec® PLUS poderá ter interesse na triagem de mulheres HR-HPV positiva sem alterações na citologia ou com alterações minor (ASC-US e LSIL). Contudo, a relação custo-benefício deveria ser avaliada tendo em conta a nossa realidade nacional, com vista à sua inclusão no programa nacional de rastreio do CCU não como primeira linha, mas como adjuvante ou em estratégias combinadas, permitindo delinear algoritmos de execução e seguimento apropriados.

Contribuição de cada autor:

João Furtado (autor principal e correspondência): Contribuições substanciais para a conceção e delineamento, recolha de dados, análise e interpretação dos dados. Participação na redação e revisão crítica do artigo no que respeita a conteúdo intelectualmente importante. Revisão da versão final do manuscrito.

Inês Rodrigues, Rui Raposo e Ana Rita Possante: Contribuições para a conceção e delineamento, análise e interpretação dos dados. Participação na revisão crítica do artigo no que respeita a conteúdo intelectualmente importante. Revisão da versão final do manuscrito.

Carolina Gregório, Inês Santos e Tatiana Mira: Participação na investigação da temática e na obtenção de recursos. Contribuições na validação, análise e interpretação dos dados, e revisão crítica do artigo no que respeita ao conteúdo intelectualmente importante.

Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Os autores declaram não ter recebido qualquer financiamento para a realização do estudo.

Agradecimentos: Gostaríamos de expressar o nosso agradecimento à Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve (UAlgESS) e ao Serviço de Anatomia Patológica do CHUA, especificamente à Dr^a Susana Vicente e ao Dr. José Luís Morera por continuamente promoverem e apoiarem a investigação científica desenvolvida em colaboração com a UAlgESS.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não possuir qualquer tipo de conflitos de interesse.

6. References

1. Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*. 2017;123(13):2404–12.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. GLOBOCAN: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. [Internet]. Vol. 71, CA: a cancer journal for clinicians. 2021 [cited 2021 Dec 5]. Available from: doi: 10.3322/caac.21660.
3. Jiang L, Tian X, Peng D, Zhang L, Xie F, Bi C, et al. HPV prevalence and genotype distribution among women in Shandong Province, China: Analysis of 94,489 HPV genotyping results from Shandong's largest independent pathology laboratory. *PLoS One*. 2019;14(1):1–14.
4. Chelimo C, Woulde TA, Cameron LD, Elwood JM. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *J Infect* [Internet]. 2013;66(3):207–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2012.10.024>
5. Direcção-Geral da Saúde. Vacinação contra infecções por Vírus do Papiloma Humano (HPV). 2008.

6. Direcção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação (PNV) Introdução da vacina contra infecções por Vírus do Papiloma Humano [Internet]. 2008. Available from: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i010243.pdf>
7. Direcção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação 2020 Norma no 018/2020 de 27/09/2020 [Internet]. 2020. Available from: <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0182020-de-27092020-pdf.aspx>
8. Diário da Republica. Gabinete do Secretário de Estado Adjunto e da Saúde. Despacho n.o 8254/2017 - Diário da República n.o 183/2017, Série II de 21 de setembro de 2017 [Internet]. 2017. Available from: <http://www.sg.min-saude.pt/NR/rdonlyres/CE1B2B55-9244-46E7-8629-CBEF56793C9B/43945/0000200002.pdf>
9. Bhatla N, Singhal S. Primary HPV screening for cervical cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2020;65:98–108. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008>
10. Mitra A, Tzafetas M, Lyons D, Paraskevaidis E, Kyrgiou M. Cervical intraepithelial neoplasia: Screening and management. *Br J Hosp Med*. 2016;77(8):C118–23.
11. Tjalma WAA, Kim E, Vandeweyer K. The impact on women’s health and the cervical cancer screening budget of primary HPV screening with dual-stain cytology triage in Belgium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2017;212:171–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.01.010>
12. Walker J. A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188(6):1393–400.
13. Alaghebandan R, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Lear A, et al. Performance of ProEx C and PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA tests in comparison with the hybrid capture 2 HPV DNA test for triaging ASCUS and LSIL cytology. *Diagn Cytopathol*. 2013;41(9):767–75.
14. Tjalma WAA. Diagnostic performance of dual-staining cytology for cervical cancer screening: A systematic literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2017;210:275–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.01.009>
15. Yu L, Fei L, Liu X, Pi X, Wang L, Chen S. Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. *J Cancer*. 2019;10(12):2654–60.
16. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. P16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathol*. 2011;119(3):158–66.
17. Peeters E, Wentzensen N, Bergeron C, Arbyn M. Meta-analysis of the accuracy of p16 or p16/Ki-67 immunocytochemistry versus HPV testing for the detection of CIN2+/CIN3+ in triage of women with minor abnormal cytology. *Cancer Cytopathol*. 2019;127(3):169–80.
18. Roche Diagnostics. CINtec® PLUS Cytology [Internet]. Be certain – Triage with CINtec® PLUS Cytology. 2020 [cited 2020 Nov 13]. Available from: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/tests/cintec-plus.html>
19. Roche Diagnostics. cobas® HPV [Internet]. cobas® HPV Test: Delivering confidence with 3-in-1 HPV test results. 2021 [cited 2021 Jul 30]. Available from: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-hpv.html>
20. Hologic. ThinPrep 2000 System [Internet]. ThinPrep 2000 System. 2020 [cited 2021 Jul 30]. Available from: <http://www.hologic.ca/products/clinical-diagnostics-and-blood-screening/instrument-systems/thinprep-2000-system>
21. Ratnam S, Jang D, Gilbert L, Alaghebandan R, Schell M, Needle R, et al. CINtec PLUS and cobas HPV testing for triaging Canadian women referred to colposcopy with a history of low-grade squamous intraepithelial lesion: Baseline findings. *Papillomavirus Res* [Internet]. 2020;10:100206. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2020.100206>
22. Abreu Â, Silva R, Fernandes S. Validation of CINtec® PLUS cytology kit in the diagnosis of persistent HPV infections - Cohort study in the Portuguese population. *J Cytol* [Internet]. 2021;38(2):94–100. Available from: <https://www.jcytol.org/text.asp?2021/38/2/94/315771>
23. McMenamin M, McKenna M, McDowell A. Clinical utility of CINTEC plus triage in equivocal cervical cytology and human papillomavirus primary screening. *Am J Clin Pathol*. 2018;150(6):512–21.
24. Tewari P, White C, Kelly L, Pilkington L, Keegan H, D’Arcy T, et al. Clinical performance of the Cobas 4800 HPV test and the Aptima HPV assay in the management of women referred to colposcopy with minor cytological abnormalities. *Diagn Cytopathol*. 2018;46(12):987–92.
25. Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: A systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol*. 2007;104(1):232–46.
26. Nobbenhuis MAE, Helmerhorst TJM, Van Den Brule AJC, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, et al. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet*. 2001;358(9295):1782–3.
27. Stoler MH, Baker E, Boyle S, Aslam S, Ridder R, Huh WK, et al. Approaches to triage optimization in HPV primary screening: Extended genotyping and p16/Ki-67 dual-stained cytology—Retrospective insights from ATHENA. *Int J Cancer*. 2020 May 6;146(9):2599–607
28. Sousa H, Tavares A, Campos C, Marinho-Dias J, Brito M, Medeiros R, et al. High-Risk human papillomavirus genotype distribution in the Northern region of Portugal: Data from regional cervical cancer screening program. *Papillomavirus Res* [Internet]. 2019;8(May):100179. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.100179>

29. Braaten KP, Laufer MR. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev Obstet Gynecol* [Internet]. 2008;1(1):2–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701931><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2492590>
30. White CM, Bakhiet S, Bates M, Ruttle C, Pilkington LJ, Keegan H, et al. Exposure to tobacco smoke measured by urinary nicotine metabolites increases risk of p16/Ki-67 co-expression and high-grade cervical neoplasia in HPV positive women: A two year prospective study. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2020;68(July 2020):101793. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2020.101793>

Article

RASTREIO DO CANCRO DO COLO DO ÚTERO DOS AÇORES – A MUDANÇA DE PARADIGMA

Débora Maciel^{1*}, Sílvia Fernandes² & Regina A. Silva³

¹ Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada EPER, Avenida D. Manuel I, 9500-370 Ponta Delgada, São Miguel, Açores; Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.PORTO), Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400, 4200-072 Porto, Portugal; email: debora.cm.maciell@azores.gov.pt

² Área Técnico-Científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica, ESS|P.PORTO, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400, 4200-072 Porto, Portugal; Centro de Investigação em Saúde Translacional e Biotecnologia Médica, ESS|P.PORTO, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400, 4200-072 Porto, Portugal; email: smf@ess.ipp.pt

³ Área Técnico-Científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica, ESS|P.PORTO, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400, 4200-072 Porto, Portugal; Centro de Investigação em Saúde e Ambiente, ESS|P.PORTO, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400, 4200-072 Porto, Portugal; email: ras@ess.ipp.pt

* Autor correspondente: debora.cm.maciell@azores.gov.pt

Resumo: O programa de Rastreio Organizado do Cancro do Colo do Útero dos Açores (ROCCA) está implementado desde 2010 com o objetivo de diagnosticar precocemente lesões precursoras de malignidade e carcinoma invasivo. A metodologia primária de rastreio utilizada nos três primeiros ciclos do ROCCA foi a citologia líquida, e a partir do quarto ciclo, desde 2021, foi aprovada a alteração para o teste de HPV (*Aptima™ HPV Assay*).

Este trabalho pretende analisar os resultados obtidos nos três primeiros ciclos do ROCCA (2010 a 2019), e avaliar o impacto previsto com as alterações implementadas no quarto ciclo. Para tal, foi feita a consulta e análise dos dados disponíveis no Manual Executivo e nos relatórios de atividades do ROCCA, onde foram consideradas 76.318 mulheres rastreadas.

Os resultados disponíveis mostram uma taxa de participação populacional inferior a 45%. A frequência de resultados citológicos de atipias ASC-US/HPV+ e ASC-H aumentou ao longo do período em análise, verificando-se um ligeiro aumento do número de casos de CIN1 e CIN2/3, assim como de lesões invasoras confirmadas histologicamente. A taxa de resultados insatisfatórios aumentou, atingindo valores de 2,7% no terceiro ciclo. Adicionalmente, a taxa de consultas de aferição foi de 2,3%, com uma correlação cito-histológica de 66%.

No global, os indicadores podem ser melhorados com a implementação de um teste de rastreio mais robusto e sensível para a deteção de HPV, como é o caso da metodologia de RNA mensageiro. Contudo, é crucial investir na promoção da literacia em saúde e sensibilização da população da região para o rastreio.

Palavras-chave: Neoplasia intraepitelial cervical (C04.557.470.200.240.250), Papilomavírus Humano (B04.613.204.655.050), Prevenção secundária (SP2.840.385.619.561), Açores (Z01.639.040.218)

Citation: Maciel, D.; Fernandes, S.; Silva, R. Rastreio do Cancro do Colo do Útero dos Açores- A Mudança de Paradigma. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2023 Mar 11;1(1): 63-75.

Academic Editor: Diana Martins

Received: 27 January 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 11 March 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences.

Abstract: The program Rastreio Organizado do Cancro do Colo do Útero dos Açores (ROCCA) has been implemented since 2010 for the early detection of precursor lesions and invasive carcinoma. The primary screening methodology used in the first three cycles of ROCCA was the liquid-based cytology, and for the fourth cycle, since 2021, it has been approved the change for the HPV test (*Aptima™ HPV Assay*).

This work intends to analyze the results obtained in the first three cycles of ROCCA (2010 to 2019), and to evaluate the expected impact of the changes implemented in the fourth cycle. To this end, data available in the Executive Manual and activity reports of the ROCCA were consulted and analyzed, in which 76,318 screened women were considered.

The available results show a population participation rate lower than 45%. The frequency of ASC-US/HPV+ and ASC-H cytological results increased over the period under analysis, with a slight increase in the number of CIN1 and CIN2/3 cases, as well as invasive entities histologically confirmed. The rate of unsatisfactory results increased, reaching values of 2.7% in the third cycle. In turn, the cervical pathology consultation rate was 2.3%, with a cytohistological correlation of 66%.

Overall, the indicators can be improved with the implementation of a more robust and sensitive screening test for HPV detection, as is the case of the messenger RNA methodology. However, it is crucial to invest in the promotion of health literacy and awareness of the population in the region for the screening.

Key-words: Cervical Intraepithelial Neoplasia (C04.557.470.200.240.250), Human papillomavirus (B04.613.204.655.050), Secondary Prevention (SP2.840.385.619.561), Azores (Z01.639.040.218)

1. Introdução

O cancro do colo do útero (CCU) é um dos cancros mais frequentes em mulheres e está relacionado, em mais de 99% dos casos, com a infeção persistente de subtipos de Vírus do Papiloma Humano de alto risco (HPV-AR) (1–3). A localização anatómica do útero e a facilidade de colheita da amostra por raspagem da superfície epitelial, assim como a existência de lesões precursoras de malignidade permitem um rastreio eficaz na redução da incidência, morbidade e mortalidade por este tipo de cancro (4–6). Com os planos de vacinação implementados atualmente em vários países será possível perceber as alterações na incidência de CCU após três ou quatro décadas. Desta forma, o uso da citologia no rastreio de lesões precursoras de malignidade continua a ser benéfico com um impacto a curto prazo na população, independente da vacinação (7).

A nível global, o CCU é o cancro com a quarta maior taxa de incidência e mortalidade; é o sexto cancro mais frequente nas mulheres europeias, e é o sétimo mais frequente em Portugal (8–12). Nos Açores, dados relativos ao período entre 1996 e 2016 indicam que o CCU era o quinto mais frequente, representando 1,6% dos casos de cancro na população geral (13). Contudo, tem-se assistido a uma diminuição na incidência de CCU nos últimos anos, inclusivamente nos Açores, apresentando, em 2019, um dos valores de incidência mais baixos a nível nacional (14).

Nas últimas décadas, o teste de rastreio de CCU em Portugal tem sido a citologia, tendo sido registada uma redução na incidência e mortalidade por CCU entre 70 e 80% (5,15,16). A citologia tem apresentado uma especificidade consistente de aproximadamente 98%, mas uma sensibilidade mais baixa e mais variável, entre 55 e 80%, para deteção de carcinoma invasivo. Por sua vez, este método apresenta uma sensibilidade significativamente inferior na identificação de lesões glandulares (15,17).

Atualmente, de acordo com diretrizes europeias e internacionais, o teste de HPV está a ser utilizado na maioria dos países europeus como método primário de rastreio do CCU. Esta metodologia apresenta sensibilidade superior à da citologia, com um valor preditivo negativo (VPN) muito próximo dos 100%, e elevada taxa de reprodutibilidade (2,17–19).

A combinação dos dois métodos revela-se uma abordagem com elevada sensibilidade no rastreio que, aliada à evolução relativamente lenta da infeção por HPV para neoplasia, permite aumentar o período entre testagens para 5 anos, quando os resultados de ambos os testes são negativos (15).

Na Região Autónoma dos Açores (RAA) existe, desde 1990, um projeto de rastreio de lesões precursoras de malignidade como medida de saúde pública na prevenção do CCU. Em 2010, este projeto foi revisto e passou a ser implementado o programa de Rastreio Organizado do Cancro do Colo do Útero dos Açores (ROCCA). O ROCCA é um programa de saúde pública de base populacional e de âmbito regional que envolve todas as Unidades de Saúde do Sistema Regional de Saúde dos Açores e apresenta cobertura geográfica de 100% (4,20,21).

É elegível para rastreio toda a população assintomática inscrita na lista de utentes das Unidades de Saúde de Ilha, na faixa etária entre 25 e 64 anos. A presença de sinais e/ou sintomas de doença ginecológica e ausência de início da atividade sexual são critérios de exclusão temporária; mulheres com cancro do colo uterino diagnosticado e mulheres submetidas a histerectomia total constituem critérios de exclusão definitiva (22).

Nos primeiros três ciclos do programa de rastreio foi usada como metodologia a realização de exame ginecológico e colheita de citologia do colo do útero em meio líquido (*ThinPrep*[®] Pap Test), realizada com periodicidade de 3 anos (6,23). A amostra é processada automaticamente em equipamento *ThinPrep*[®]2000 da *Hologic*, para obtenção de preparações citológicas em monocamada e para avaliação microscópica de alterações celulares. No caso de resultado negativo, a utente volta a ser convocada para o rastreio no ciclo seguinte. Se o resultado for positivo a utente é referenciada para consulta hospitalar. No caso de o resultado ser de atipia de células pavimentosas de significado indeterminado (ASC-US) é realizado, na mesma amostra, o teste molecular para deteção de DNA de HPV-AR. Perante um resultado positivo para HPV-AR, a utente é encaminhada para consulta de patologia cervical.

Em 2019, a partir do início do quarto ciclo do ROCCA, foi aprovada uma alteração no teste de rastreio de CCU, passando a ser usado o teste de HPV (*Aptima*[™] HPV Assay). Desta forma, é realizado um exame ginecológico para colheita da citologia cervical em meio líquido na qual é feita a pesquisa de RNA mensageiro (mRNA) de catorze subtipos oncogénicos de HPV-AR, realizado de 5 em 5 anos (4,6,23,24). Se o resultado for positivo, é feita a genotipagem para distinguir os subtipos HPV 16 e HPV 18/45 dos restantes subtipos de HPV-AR, através do kit *Aptima*[™] HPV 16 18/45 Genotype Assay. Nos casos negativos para HPV 16 ou HPV 18/45, é processada a citologia líquida para avaliar a presença de alterações citológicas; e se o resultado for positivo para HPV 16, 18/45 a utente é referenciada para a consulta de patologia cervical. Se o resultado da citologia reflexa for neoplasia intraepitelial do colo do útero ou carcinoma invasivo, a utente sai do rastreio e é tratada e acompanhada em contexto hospitalar. Perante um resultado citológico negativo, a utente prossegue no programa de rastreio e repete o teste de HPV após 5 anos (25).

O ROCCA está implementado há 12 anos e as características e evolução histórica encontram-se ilustradas na **Figura 1**.

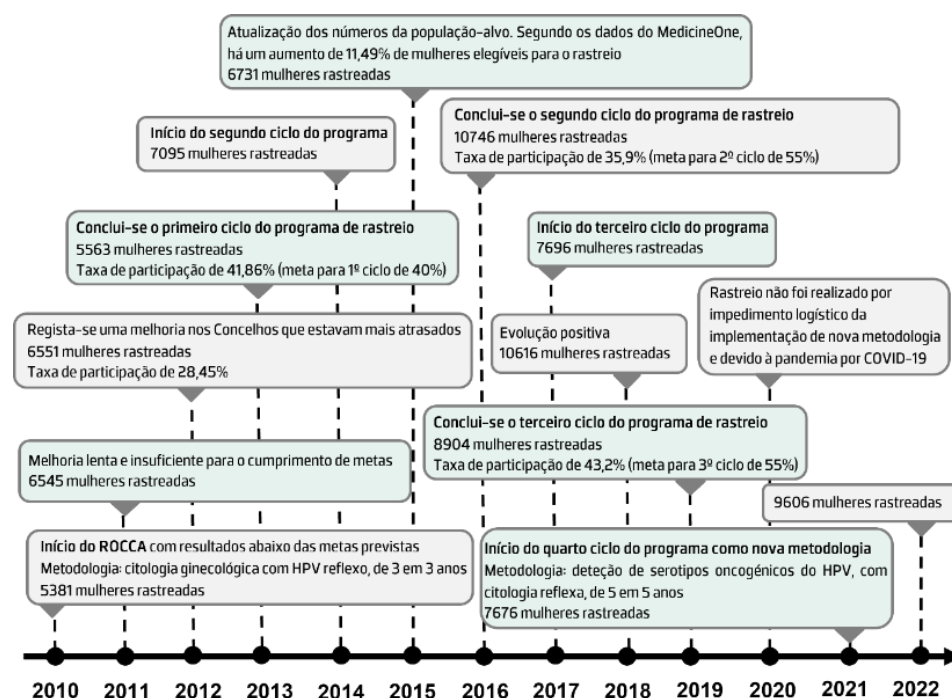


Figura 1. Evolução histórica do programa ROCCA. *Fonte: Manual executivo do ROCCA e Relatório de atividades 2021 do Centro de Oncologia dos Açores (4,20).*

2. Objetivo

Este trabalho pretende analisar os resultados obtidos no primeiro, segundo e terceiro ciclos do ROCCA (2010 a 2019), e avaliar o impacto previsto com as alterações implementadas no quarto ciclo, desde 2021, nomeadamente o uso do teste de HPV de mRNA enquanto ferramenta primária de rastreio do CCU.

3. Material e Métodos

O presente estudo retrospectivo baseou-se na análise dos dados do primeiro, segundo e terceiro ciclos do ROCCA. Foi realizada a consulta, levantamento e análise dos dados disponíveis no Manual executivo do ROCCA e nos relatórios de atividades do Centro de Oncologia dos Açores (COA) existentes (4,20).

Foram consideradas todas as mulheres convocadas e que participaram no programa ROCCA, no período compreendido entre 2010 e 2019, de entre a população-alvo elegível, num total de 76.318 mulheres.

4. Resultados

A monitorização e avaliação da eficiência do programa de rastreio implementado é feita com base na análise de diversos indicadores, como a taxa de participação no rastreio, resultados citopatológicos, resultados clínicos de seguimento e a taxa de resultados insatisfatórios, que per-

mitem perceber quais os aspetos que podem ser melhorados a nível da comunicação com a população-alvo, ao nível da colheita, procedimento técnico-laboratorial e diagnóstico, assim como caracterizar a população em relação à patologia cervical e avaliar o valor preditivo positivo (VPP) do teste utilizado.

1.1 Taxa de participação e adesão de mulheres convocadas

A taxa de participação populacional (Tpp) corresponde ao número de mulheres da população-alvo com, pelo menos, um teste de rastreio realizado no período dos ciclos definidos.

Em programas de rastreio semelhantes, é habitual a Tpp no primeiro ciclo seja inferior à Tpp de ciclos subsequentes. Com base no projeto inicial do ROCCA, a Tpp esperada para o primeiro ciclo era de 40%, e para o segundo e terceiro ciclo era de 55% (20,26).

Os resultados de Tpp registados foram de 41,9% no primeiro ciclo, 36,0% no segundo e de 43,2% no terceiro ciclo, abaixo do esperado, de acordo com a **Figura 2**.

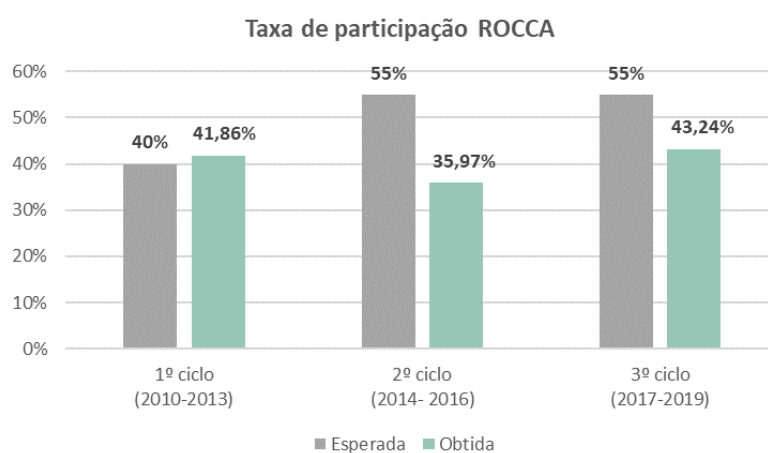


Figura 2. Representação gráfica da taxa de participação populacional do programa ROCCA. *Fonte: Manual executivo do ROCCA e Relatório de atividades 2021 do COA (4,20).*

Da análise dos dados verifica-se um aumento de 2,2% no número de mulheres rastreadas do primeiro para o segundo ciclo e de 12,8% do segundo para o terceiro ciclo. A taxa de aferição (percentagem de mulheres encaminhadas para consulta de patologia cervical), foi em média de 2,3% e manteve-se constante ao longo dos ciclos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Indicadores de monitorização por ciclo de rastreio

	1º ciclo (2010-2013)	2º ciclo (2014-2016)	3º ciclo (2017-2019)	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Utentes rastreadas	24 032 (41,86)	24 572 (36,97)	27 714 (43,24)	76 318 (40,20)
Consultas de aferição	619 (2,58)	602 (2,45)	667 (2,41)	1 888 (2,27)

4.1.1 Adesão por ilha

A análise da Figura 3 revela que a Tpp varia de ilha para ilha, tendo-se registado na ilha de Santa Maria a maior taxa de adesão, nos três ciclos, seguida da ilha do Pico (Figura 3). As ilhas

com mais população, São Miguel, Terceira e Faial, apresentaram menor adesão ao rastreio, sendo a ilha das Flores a que apresenta o valor mais baixo (Figura 3).

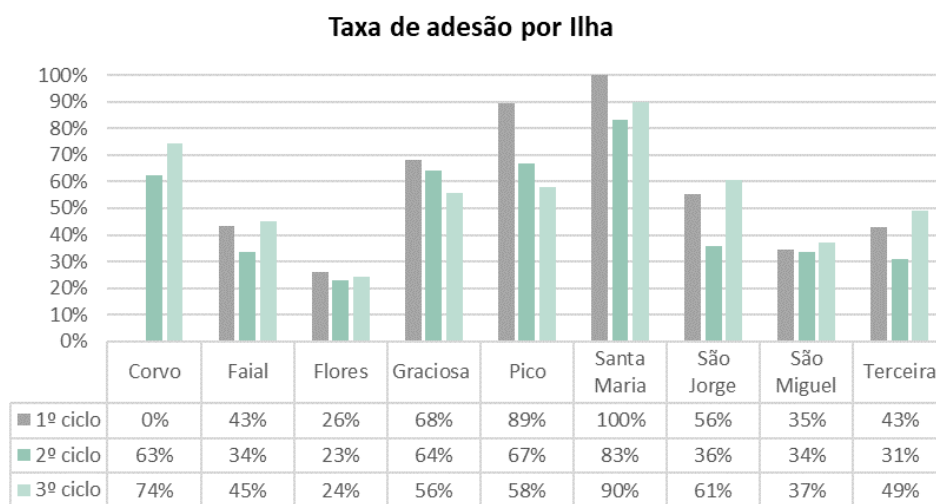


Figura 3. Representação gráfica da taxa de adesão ao rastreio por ilha. *Fonte: Manual executivo do ROCCA e Relatório de atividades 2021 do COA (4,20).*

4.2 Indicadores citopatológicos

A taxa de deteção de lesões precursoras constitui um indicador capaz de avaliar a prevalência das lesões do colo do útero, estando os dados da população do ROCCA descritos na **Tabela 2**.

Nos três primeiros ciclos, foi utilizada a citologia em meio líquido (*ThinPrep*[®] Pap Test) para colheita das amostras cervicovaginais num total de 77.688 amostras, referentes a 76.318 mulheres rastreadas.

Tabela 2. Indicadores citopatológicos por ciclo de rastreio

Resultado citológico	1º ciclo (2010-2013)	2º ciclo (2014-2016)	3º ciclo (2017-2019)
	n (%)	n (%)	n (%)
Negativo	17209 (72)	17789 (73)	21163 (76)
ASC-US HPV+	7 (0,03)	20 (0,08)	74 (0,27)
ASC-H	10 (0,04)	2 (0,01)	18 (0,06)
LSIL	490 (2,04)	460 (1,87)	464 (1,67)
HSIL	106 (0,44)	118 (0,48)	104 (0,38)
Outras*	6 (0,02)	2 (0,01)	6 (0,02)

*ASC-US: células pavimentosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H: células pavimentosas atípicas que não excluem lesão de alto grau; LSIL: Lesão intraepitelial pavimentosa de baixo grau; HSIL: Lesão intraepitelial pavimentosa de alto grau; *Outros resultados citológicos não discriminados.*

Com o decorrer dos ciclos, verifica-se que existem ligeiras diferenças nos resultados citológicos atribuídos. A percentagem de resultados negativos manteve-se ao longo dos ciclos, assim como o número de lesões intraepiteliais pavimentosas de baixo grau (LSIL). Por sua vez, verifica-se um aumento no número de atipias detetadas (ASC-US/HPV+ e ASC-H) (Tabela 2).

Em todas as amostras com resultado citológico de ASC-US foi realizado o teste de HPV, sendo que 101 apresentaram resultado positivo (Tabela 2).

4.3 Qualidade da amostra

A qualidade da amostra é um indicador que reflete o desempenho da técnica de colheita, fixação, processamento e coloração da amostra e que poderá ter um grande impacto no resultado citológico. São considerados resultados insatisfatórios aqueles em que não foi possível obter diagnóstico numa primeira colheita, sendo necessário as mulheres realizarem a repetição do exame. A presença de artefactos, contaminantes, elementos de obscurecimento celular, como a presença de grande quantidade de sangue ou um intenso exsudado inflamatório, e a escassez de células epiteliais pavimentosas são os principais fatores causais para atribuição de um resultado insatisfatório.

Tabela 3. Avaliação da qualidade da amostra.

	1º ciclo (2010-2013)	2º ciclo (2014-2016)	3º ciclo (2017-2019)
	n (%)	n (%)	n (%)
Resultados insatisfatórios	200 (0,83)	413 (1,69)	757 (2,73)
Resultados inconclusivos	SD	119 (0,49)	291 (1,05)
Total	200 (0,83)	532 (2,2)	1 048 (3,8)

Legenda: SD - sem dados

Ao longo dos primeiros três ciclos, verificou-se que o número de novas colheitas por resultados insatisfatório aumentou substancialmente, registando-se no terceiro ciclo uma taxa de repetições três vezes superior à registada no primeiro ciclo (**Tabela 3**). No período em análise, a média da taxa de resultados insatisfatórios foi de 1,75%.

Os resultados inconclusivos dizem respeito àqueles em que não foi possível a obtenção de diagnóstico, mesmo após repetição, ou os casos em que a mulher recusou ou não compareceu para repetição da colheita. No terceiro ciclo de rastreio registou-se um aumento de 145% de resultados inconclusivos, em comparação ao segundo ciclo (**Tabela 3**).

4.4 Indicadores clínicos e seguimento

O seguimento das pacientes é feito de acordo com as *guidelines* do Consenso da Sociedade Portuguesa de Ginecologia, Secção Portuguesa de Colposcopia e Patologia Cervico-Vulvovaginal de 2010. Perante um resultado citológico negativo ou de ASC-US com teste de HPV negativo, a mulher é orientada para reintegração no ROCCA. Uma paciente com resultado citológico de ACS-US/HPV+, ou de lesão intraepitelial pavimentosa, é referenciada para consulta de ginecologia/unidade de patologia cervical. Em consulta de aferição, todas as pacientes com alterações citológicas foram submetidas a colposcopia, com eventual biopsia ou outra intervenção dirigida. Na **Tabela 4** estão registadas as frequências dos diagnósticos histológicos das amostras colhidas após colposcopia.

Tabela 4. Frequências absolutas e relativas dos resultados histológicos de seguimento

Diagnóstico	1º ciclo (2010-2013)	2º ciclo (2014-2016)	3º ciclo (2017-2019)
	n (%)	n (%)	n (%)
CIN1	230 (37,16)	217 (36,05)	286 (42,88)
CIN2/3	109 (17,61)	137 (22,76)	121 (18,14)
Carcinoma <i>in situ</i>	18 (2,91)	15 (2,49)	10 (1,5)
Adenocarcinoma <i>in situ</i>	1 (0,16)	0	1 (0,15)
Carcinoma espinocelular invasivo	7 (1,13)	8 (1,33)	9 (1,35)
Adenocarcinoma invasivo	1 (0,16)	3 (0,5)	2 (0,3)

A correlação citohistológica permite determinar o VPP da citologia com base no número de casos de CIN2/3+ previamente identificados citologicamente. Os resultados dos três primeiros ciclos mostram uma correlação citohistológica relativamente elevada, com uma média de 66%. Ao longo dos três ciclos, foi registado um aumento de cerca de 10%, sendo o valor de 61,6% no primeiro, de 64,8% no segundo e de 70,8% no terceiro ciclo.

As mulheres com resultado de lesão epitelial diagnosticada por biopsia foram submetidas a diferentes tipos de abordagem, em que a conização foi realizada como abordagem diagnóstica e/ou terapêutica em 33% dos casos no primeiro ciclo, 52% no segundo e, no terceiro ciclo correspondeu a 35% do total de intervenções.

5. Discussão

A avaliação e monitorização dos diferentes indicadores é fundamental para entender o estado atual do rastreio, antever resultados, assim como corrigir e intervir precocemente para a garantia do sucesso do programa.

A taxa de participação de mulheres no ROCCA é baixa, com uma média de cerca de 40% no decorrer dos três ciclos, sendo consideravelmente inferior à que se encontra registada para o continente português (Tpp de 78%, em 2019) (16,21,27). Para além disso, há estudos que abordam os fatores associados à não-adesão ao rastreio do CCU em Portugal, verificando-se diferenças no que diz respeito à localização geográfica de residência, sendo os Açores apontados como umas das regiões de menor adesão (28). Existem vários fatores que influenciam o comportamento de adesão ao rastreio, nomeadamente os intrínsecos, como as crenças sobre a saúde e a doença, o medo da dor, a relação com a equipa de saúde e a motivação; e os extrínsecos, relacionados com as políticas de saúde e o contexto social das mulheres que recorrem aos cuidados de saúde no âmbito da saúde sexual e reprodutiva. São também fatores determinantes para a adesão o rendimento mensal, o grau de escolaridade, as redes de apoio social e a distância da unidade de rastreio e acessibilidade de transportes (29,30).

A análise efetuada à taxa de adesão por ilha, permite perceber algumas discrepâncias. Em particular na ilha do Corvo, na qual não foi realizado rastreio no primeiro ciclo por falta de recursos humanos. Na ilha das Flores, a baixa adesão também é justificada pelo reduzido número de

mulheres convocadas em relação às rastreáveis. Nas ilhas com mais população e com mais recursos, São Miguel, Terceira e Faial, a taxa de adesão foi mais baixa do que a média. As razões para a existência das desigualdades encontradas entre as diferentes áreas geográficas não são claras, podendo ser resultado das diferenças nas características da população das várias regiões e no acesso aos cuidados de saúde da mulher disponíveis em cada uma das ilhas.

Para os baixos valores de adesão da população, podem também ter contribuído as medidas de informação e incentivo ao rastreio adotadas. A este nível, podem ainda ser implementadas algumas estratégias já identificadas e descritas, como a disponibilização de mais informação sobre os benefícios do rastreio; sensibilização dos profissionais de saúde para o incentivo das utentes a participar no programa e promover a saúde sexual e reprodutiva da mulher; a identificação dos determinantes de não-adesão ao programa através de grupos focais com utentes, assim como reduzir as desigualdades de acesso ao programa (16,29).

Nos três primeiros ciclos do ROCCA, é importante notar que o número de mulheres convocadas foi bastante inferior às elegíveis por ano, o que reflete uma oportunidade de melhoria ao nível da organização interna das unidades de saúde e expansão dos recursos humanos destacados para o programa.

Relativamente aos indicadores citopatológicos, o *College of American Pathologists* (CAP) refere que em amostras de meio líquido, o resultado de LSIL representa, em média, 2,9% e o de HSIL de 0,5% (31). Nos três primeiros ciclos do ROCCA, verificou-se que 1,86% dos resultados foram LSIL e 0,43% foram HSIL. Estes dados revelam que o método de rastreio utilizado funciona e que permite identificar uma proporção de lesões precursoras de acordo com o descrito na literatura (31). Contudo, outro importante indicador da metodologia utilizada é a qualidade da amostra. Uma amostra satisfatória não deve apresentar características como a presença de sangue, inflamação, substâncias lubrificantes ou outras condições que impossibilitem a obtenção de diagnóstico (31). Num programa de rastreio de alta cobertura é expectável que haja alguns resultados insatisfatórios. A taxa de resultados insatisfatórios está relacionada com a qualidade do procedimento de colheita e/ou processamento técnico-laboratorial da amostra, devendo estes ser corrigidos para evitar quer os custos associados, quer o transtorno e ansiedade para a mulher decorrentes de uma repetição de colheita. A taxa média de resultados insatisfatórios dos três ciclos foi 1,75%, valor que é ligeiramente superior aos 1,1% reportados pelo CAP (32).

A análise dos indicadores clínicos e de seguimento mostram que o número de lesões identificadas histologicamente não variou significativamente no decorrer dos três primeiros ciclos de rastreio. À medida que os ciclos aumentam, é expectável que o número de CIN2/3, carcinoma *in situ*, carcinoma e adenocarcinoma invasores diminua. Dada a baixa taxa de adesão ao ROCCA registada nos três primeiros ciclos, não foi ainda possível perceber esse efeito.

A correlação citohistológica calculada para os primeiros três ciclos do rastreio mostra que a citologia apresenta um valor VPP entre os 60% e os 70%. Estes valores estão de acordo com o que se encontra descrito na literatura (15,17), e revelam que com a citologia foi possível identificar mais de metade da população de rastreio do ROCCA para intervenção precoce e acompanhamento adequado, evitando a possível progressão para CCU.

De acordo com a *guidelines* europeias, foi aprovada a partir do quarto ciclo, a alteração para o teste de HPV (*Aptima™ HPV Assay*) como ferramenta primária no rastreio do CCU, seguida de

genotipagem nos casos positivos com recurso ao kit *Aptima™ HPV 16 18/45 Genotype Assay* (26). Adicionalmente, com base nos pontos passíveis de melhoria, verifica-se a necessidade de atuar também a nível populacional. De um modo geral, será importante avaliar o tipo de intervenções necessárias para o tratamento e acompanhamento de cada caso, tornando possível avaliar os custos associados à morbilidade do CCU, assim como avaliar o desempenho técnico para sua otimização, como uma forma de diminuir os inconvenientes e custos de repetições de exames.

Neste sentido, para o quarto ciclo de rastreio foi estimada uma Tpp de 60% da população elegível (4). Ao longo do quarto ciclo atualmente em curso é esperado um aumento de Tpp em relação aos ciclos anteriores, que se prevê ser atingido através de um maior envolvimento e compromisso das instituições afetas ao rastreio. Desta forma, será possível melhorar a literacia em saúde e o controlo de fatores de risco, investindo na realização de mais ações de informação junto da população, assim como educar, sensibilizar e incentivar à participação no rastreio. Como estratégia complementar para aumentar a adesão, poderia ser útil instituir e aconselhar às utentes a auto-colheita. A auto-colheita é uma prática cada vez mais aceite noutros países e apresenta alta fiabilidade para o rastreio de CCU com teste de HPV, favorecendo a adesão de utentes de níveis socioeconómicos mais baixos, assim como mulheres mais jovens, migrantes ou com baixos níveis de escolaridade (15,28,33). Para perceber o potencial da auto-colheita na RAA como estratégia para aumentar a Tpp, seria necessário aprofundar aspetos como a média de idade das mulheres que decidem não participar no rastreio e o motivo da decisão; perceber qual o grau de aceitação desta prática e se o contexto sociocultural é favorável.

Ainda assim, no quarto ciclo, é expectável que continue a verificar-se uma adesão mais baixa nas ilhas com mais população e com mais recursos, contribuindo para isso o facto de uma parte da população poder optar por ser acompanhada nos serviços de saúde privados. Por outro lado, nas ilhas mais pequenas, existe uma relação de confiança e de proximidade com o médico de família e enfermeiros, maior comunicação e, conseqüentemente, maior comprometimento e adesão ao rastreio (30).

A principal alteração realizada no quarto ciclo do ROCCA foi a implementação do teste de HPV como ferramenta de rastreio primário. O rastreio com base no teste de HPV tem uma maior sensibilidade e precisão, menor variabilidade e melhor reprodutibilidade, quando comparado com a citologia. Estas características permitem alargar o período de rastreio, rentabilizar recursos, aumentar o número de amostras analisadas e, conseqüentemente, o número de mulheres rastreadas. Com a implementação da metodologia de mRNA (*Aptima™ HPV Assay*), e prevendo-se que o método de colheita será o mesmo, é ainda assim expectável uma diminuição da taxa de resultados insatisfatórios/inconclusivos, uma vez que a metodologia de teste de HPV é mais robusta e menos sensível a variações quando comparada com a citologia morfológica (2,3,15,18,34,35).

Adicionalmente, a deteção da presença do vírus com base na expressão de mRNA revela-se uma tecnologia custo-efetiva, com maior especificidade (3,4). Com base nos dados dos ciclos anteriores e na metodologia de teste de HPV adotada, é expectável que no quarto ciclo a taxa de aferição seja mais elevada, o que significa que serão detetados mais casos positivos em que há a necessidade de intervenção ou acompanhamento específico, refletindo um método de rastreio mais sensível. A taxa de resultados negativos também deverá ser superior, refletindo uma

maior capacidade de triagem das mulheres que não apresentam risco de desenvolver cancro do colo do útero no período definido, indicando maior especificidade da nova metodologia.

Com a evolução do programa de rastreio é ainda expectável o diagnóstico de um menor número de casos de CIN2/3+, indicando que as mulheres com risco aumentado de desenvolvimento de cancro estão a ser identificadas e tratadas precocemente.

6. Conclusões

No decorrer do programa ROCCA foi rastreada quase metade da população dos Açores elegível para rastreio do CCU, o que contribuiu significativamente para a prevenção do desenvolvimento de cancro cervical na região. Com a implementação da metodologia de mRNA (*Aptima™ HPV Assay*) no quarto ciclo do programa, é expectável uma diminuição da taxa de resultados insatisfatórios e um aumento do VPP do método. Em conjunto com medidas de sensibilização e promoção da literacia em saúde da população, é de esperar que estas alterações permitam melhorar os indicadores de eficácia do ROCCA nos próximos ciclos.

Contribuição dos autores: Conceptualização, Débora Maciel, Sílvia Fernandes; Metodologia, Débora Maciel; Análise formal, Débora Maciel, Sílvia Fernandes, Regina A. Silva; Investigação, Débora Maciel, Sílvia Fernandes; Escrita—escrita da versão original, Débora Maciel; Escrita – revisão e edição, Sílvia Fernandes, Regina A. Silva.

Todos os autores leram e concordaram com a versão do manuscrito publicada. A autoria do trabalho deve estar limitada àqueles que contribuíram substancialmente para o trabalho.

Financiamento: Este trabalho não beneficiou de financiamento externo.

Agradecimentos: Os autores prestam o seu agradecimento ao Centro de Oncologia dos Açores pela disponibilização dos dados referentes ao programa de rastreio; ao Dr. Vítor Carneiro, Diretor Clínico do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada, e ao Dr. José Cabral, Diretor Clínico do Labap, Laboratório de Anatomia Patológica, Lda. pela colaboração e apoio.

Conflito de Interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

6. Referências bibliográficas

1. World Health Organization. Cervical cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>. 2022.
2. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2021 Oct 1;155(S1):28–44.
3. Derby A, Mekonnen D, Woldeamanuel Y, van Ostade X, Abebe T. HPV E6/E7 mRNA test for the detection of high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+): a systematic review. *Infect Agent Cancer [Internet]*. 2020 Feb 7 [cited 2022 Oct 30];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32047531/>
4. Centro de Oncologia dos Açores Prof. Doutor José Conde. Manual executivo do ROCCA. Governo do Açores e Centro de Oncologia dos Açores Prof. Doutor José Conde. 2021.
5. Eun TJ, Perkins RB. Screening for Cervical Cancer. *Med Clin North Am [Internet]*. 2020 Nov 1 [cited 2022 Oct 9];104(6):1063. Available from: [/pmc/articles/PMC8881993/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32047531/)
6. Screening for cervical cancer. *CA Cancer J Clin [Internet]*. 2020 Sep 30 [cited 2022 Oct 9];70(5):347–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21629>
7. Simms KT, Steinberg J, Caruana M, Smith MA, Lew J bin, Soerjomataram I, et al. Impact of scaled up human papillomavirus vaccination and cervical screening and the potential for global elimination of cervical cancer in 181 countries, 2020–99: a modelling study. *Lancet Oncol [Internet]*. 2019 Mar 1 [cited

- 2022 Oct 4];20(3):394–407. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1470204518308362/fulltext>
8. Sociedade Portuguesa de Ginecologia – Secção de Genecologia Oncológica. Cancro Ginecológico Consensos Nacionais 2020. <https://spginecologia.pt/wp-content/uploads/2021/07/spg-consenso-nacional-cancro-ginecologico-2020.pdf>. 2020.
 9. IARC Globocan 2020. Europe. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/908-europe-fact-sheets.pdf>. 2021.
 10. IARC Globocan 2020. Portugal. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf>. 2021.
 11. Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
 12. IARC World Health Organization. WHO Classification of Tumours Female Genital Tumours. 5ª edition. Vol. 8. 2020. 335–389 p.
 13. Governo dos Açores e Centro de Oncologia dos Açores Prof. Doutor José Conde. Registo Oncológico dos Açores – 20 anos. <https://portal.azores.gov.pt/documents/37454/7fb62e42-8796-3671-fc53-db623c609969>. 2018.
 14. Instituto Português de Oncologia do Porto. RON Registo Oncológico Nacional de Todos os Tumores na População Residente em Portugal, em 2019 [Internet]. 2022 [cited 2023 Feb 17]. Available from: <https://ron.min-saude.pt/pt/biblioteca/publicacoes-ron/ron-2019/>
 15. Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, Goldstein AT. Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future. Vol. 8, *Sexual Medicine Reviews*. Elsevier B.V.; 2020. p. 28–37.
 16. Ministério da Saúde, Direção-Geral da Saúde. Estratégia Nacional de Luta contra o Cancro 2021-2030 [Internet]. 2022 [cited 2023 Feb 18]. Available from: <https://www.dgs.pt/documentos-em-discussao-publica/estrategia-nacional-de-luta-contra-o-cancro-2021-2030-entra-em-consulta-publica.aspx>
 17. Sociedade Portuguesa de Ginecologia – Secção Portuguesa de Colposcopia e Patologia Cervico-vulvovaginal. Consenso sobre infeção por HPV e neoplasia intraepitelial do colo do útero vulva e vagina 2014. 2014.
 18. Maver PJ, Poljak M. Primary HPV-based cervical cancer screening in Europe: implementation status, challenges, and future plans. Vol. 26, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2020. p. 579–83.
 19. Armaroli P, Villain P, Suonio E, Almonte M, Anttila A, Atkin WS, et al. European Code against Cancer, 4th Edition: Cancer screening. *Cancer Epidemiol*. 2015 Dec 1;39:5139–52.
 20. Centro de Oncologia Prof. Doutor José Conde. Relatório de Atividades 2021. <https://portal.azores.gov.pt/documents/37454/deb301cf-e881-3390-9175-ed4777b7ff11>. 2022.
 21. Serviço Nacional de Saúde. Direção-Geral da Saúde, Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Avaliação e Monitorização dos Rastreamentos Oncológicos Organizados de Base Populacional 2019/2020 [Internet]. 2021 [cited 2023 Feb 10]. Available from: <https://www.ffms.pt/sites/default/files/2022-07/i028766.pdf>
 22. Secretaria Regional da Saúde e Desporto, Jornal Oficial da Região Autónoma dos Açores nº 49 I série. Despacho nº 508/2021 de 11 de março 2021. 2021.
 23. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, et al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition—Summary Document. *Annals of Oncology*. 2010 Mar 1;21(3):448–58.

24. Diário da República. Despacho n.º 8254/2017, de 21 de setembro [Internet]. Diário da República n.º 183/2017, Série II de 2017-09-21. 2017 [cited 2023 Feb 18]. p. 20788–9. Available from: <https://dre.pt/dre/detalhe/despacho/8254-2017-108189401>
25. Direção Regional da Saúde Região Autónoma dos Açores. Protocolo de colaboração único. Programa organizado de rastreio do cancro do colo do útero nos Açores (ROCCA). 2019.
26. Centro de Oncologia dos Açores Prof. Doutor José Conde. Manual executivo do ROCCA. Governo do Açores e Centro de Oncologia dos Açores Prof. Doutor José Conde. 2010.
27. Instituto de Administração da Saúde. Madeira passa a ter Centro de Rastreio [Internet]. 2019 [cited 2023 Feb 11]. Available from: <https://iasaude.pt/index.php/informacao-documentacao/comunicacao-social/recortes-de-imprensa/6346-madeira-passa-a-ter-centro-de-rastreio>
28. Nunes MF. Fatores associados à não-adesão ao rastreio do cancro do colo do útero em Portugal: análise dos dados do inquérito Nacional de Saúde de 2014 [Internet]. [Lisboa]: Universidade Nova de Lisboa; 2019 [cited 2023 Feb 18]. Available from: <https://run.unl.pt/handle/10362/91475>
29. Ferreira M, Ferreira S, Ferreira N, Andrade J, Duarte J. Adesão ao Rastreio do Cancro do Colo do Útero e da Mama da Mulher portuguesa. [Viseu]: Instituto Politécnico de Viseu; 2014.
30. Patrícia J, Ramos P. Adesão ao rastreio do cancro do colo do útero: papel da empatia do Médico de Família. [Coimbra]: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2017.
31. Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. 3rd edition. Springer; 2015. 103–190 p.
32. Moriarty AT, Clayton AC, Zaleski S, Henry MR, Schwartz MR, Eversole GM, et al. Unsatisfactory Reporting Rates: 2006 Practices of Participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Gynecologic Cytology. Arch Pathol Lab Med [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2023 Feb 19];133(12):1912–6. Available from: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/133/12/1912/460637/Unsatisfactory-Reporting-Rates-2006-Practices-of>
33. Amorim R, Moutinho JAFM. Auto-colheita do teste do HPV como método de rastreio do cancro do colo do útero. [Covilhã]: Universidade da Beira Interior; 2020.
34. Arbyn M, Simon M, Peeters E, Xu L, Meijer CJLM, Berkhof J, et al. 2020 list of human papillomavirus assays suitable for primary cervical cancer screening. Vol. 27, Clinical Microbiology and Infection. Elsevier B.V.; 2021. p. 1083–95.
35. Haedicke J, Iftner T. A review of the clinical performance of the Aptima HPV assay. Vol. 76, Journal of Clinical Virology. 2016.



BioMedLab

ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS LABORATORIAIS