

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-  
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS

**MICHELLE DA SILVA PEREIRA**

**BACTÉRIAS BIOMARCADORAS NA MICROBIOTA VAGINAL  
ASSOCIADAS AO PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE COLO DE  
ÚTERO RELACIONADO À INFECÇÃO POR HPV DE ALTO  
RISCO**

**Juiz de Fora**

**2023**

**MICHELLE DA SILVA PEREIRA**

**BACTÉRIAS BIOMARCADORAS NA MICROBIOTA VAGINAL  
ASSOCIADAS AO PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE COLO DE  
ÚTERO RELACIONADO À INFECÇÃO POR HPV DE ALTO  
RISCO**

Tese de doutorado do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de Imunologia e doenças infecto – parasitárias, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: área Imunologia e doenças infecto – parasitárias.

**Orientador: Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva**

**Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz**

**Co-orientador: Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe**

**Juiz de Fora**

**2023**

da Silva Pereira , Michelle.

BACTÉRIAS BIOMARCADORAS NA MICROBIOTA VAGINAL  
ASSOCIADAS AO PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO  
RELACIONADO À INFECÇÃO POR HPV DE ALTO RISCO /

Michelle da Silva Pereira . -- 2024.

95 p. : il.

Orientadora: Vânia Lucia da Silva

Coorientadores: Cláudio Galuppo Diniz , Aripuanã Sakurada  
Aranha Watanabe

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto  
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. HPV de alto risco. 2. Câncer de colo do útero. 3. Kit preditivo de  
câncer de colo do útero. I. Lucia da Silva, Vânia, orient. II. Galuppo  
Diniz , Cláudio, coorient. III. Sakurada Aranha Watanabe , Aripuanã,  
coorient. IV. Título.

**Michelle da Silva Pereira**

**BACTÉRIAS BIOMARCADORAS NA MICROBIOTA VAGINAL ASSOCIADAS AO  
PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE COLO DE ÚTERO RELACIONADO À INFECÇÃO POR HPV  
DE ALTO RISCO**

Dissertação  
apresentada  
ao Programa de Pós-  
graduação em  
Ciências Biológicas  
da Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Doutora em  
Ciências Biológicas.  
Área de  
concentração: Imunologia  
& Doenças  
Infectoparasitárias.

Aprovada em 19 de dezembro de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profª. Dra. Vânia Lúcia da Silva** - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

**Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz** - Coorientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

**Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe** - Coorientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

**Profª. Drª. Jacy Gameiro**  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

**Profª. Drª. Yasmin Neves Vieira Sabino**

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profª. Drª. Laura Maria Andrade de Oliveira**

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

**Prof. Dr. Didier Silveira Castellano Filho**

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde - SUPREMA

Juiz de Fora, 29/11/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Galuppo Diniz, Professor(a)**, em 19/12/2023, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Yasmin Neves Vieira Sabino, Usuário Externo**, em 19/12/2023, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vania Lucia da Silva, Professor(a)**, em 19/12/2023, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Laura Maria Andrade de Oliveira, Usuário Externo**, em 19/12/2023, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Didier Silveira Castellano Filho, Usuário Externo**, em 19/12/2023, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacy Gameiro, Professor(a)**, em 19/12/2023, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aripuana Sakurada Aranha Watanabe, Professor(a)**, em 19/12/2023, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1598908** e o código CRC **E6483137**.

Dedico essa vitória a minha família,  
que mesmo diante de obstáculos,  
me apoiou; lutei e consegui vencer,  
e a maternidade me deu forças para  
prosseguir.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Deus por ter me dado força e serenidade para percorrer esse caminho.

Ao meu marido, Wander, pelo incentivo, dedicação e compreensão.

À Profa. Dra. Vânia Lucia da Silva, minha orientadora, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, incentivo, e colaboração, minha eterna admiração e gratidão.

Ao Prof. Dr. Claudio Galuppo Diniz, meu co-orientador, por sua contribuição a este trabalho, sempre compartilhando conhecimentos e ideias.

Ao Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe, meu co-orientador, cuja a confiança, incentivo e orientação foram fundamentais na realização deste trabalho. Meu eterno agradecimento.

Enfim, a todos que auxiliaram nessa jornada de crescimento profissional e pessoal, muito obrigada.

Às agências de fomento: Fapemig, CNPq e Capes.

“Acima de tudo, não perca seu desejo de caminhar. Não conheço nenhum pensamento ou fardo pesado do qual não se possa sair andando”

Kierkegaard

“Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes”.

Paulo Freire

## RESUMO

A microbiota vaginal é um ecossistema formado por bactérias aeróbias e anaeróbias, que vivem em equilíbrio dinâmico. Fatores como imunidade e variações hormonais podem provocar a perda do equilíbrio, ocasionando a proliferação de patógenos oportunistas. A vaginose bacteriana (VB) é uma doença de etiologia polimicrobiana, podendo ocorrer em associação com outros microrganismos, tais como o Papilomavirus Humano (HPV). O HPV é mais prevalente na população feminina sexualmente ativa, sendo fator de risco para o desenvolvimento de câncer cervical. Algumas bactérias presentes na microbiota vaginal podem atuar como biomarcadores da persistência da infecção e progressão da lesão para o câncer do colo do útero. O estudo dessas bactérias é fundamental para avaliar o prognóstico de mulheres HPV positivas e reduzir a taxa de mortalidade. O objetivo do trabalho foi avaliar a presença de bactérias biomarcadoras da persistência da infecção por HPV em mulheres portadoras ou não de HPV, propondo um kit preditivo de câncer do colo do útero. Secreção vaginal e raspado cervical foram coletados (n= 66) e DNA viral e bacteriano foi extraído. Reação de PCR para genotipagem do HPV foi realizada, assim como qPCR para as bactérias biomarcadoras. A média de idade das participantes foi de 35 anos, sendo a idade mínima de 18 anos e a máxima de 49 anos. Observou-se que 45% das mulheres eram brancas, 48% possuíam ensino médio completo e 47% classificaram seu estado civil como solteiras. HPV foi detectado em 80% das amostras. O HPV 18 foi o mais frequente (62%) em monoinfecção. A frequência de coinfeção por HPV 16 e 18 foi de 27%. Na faixa etária de 18 a 25 anos, 43% das mulheres apresentaram HPV 16 e 18% o HPV 18, e ainda, 33% apresentaram coinfeção por HPV 16 e 18. Foram avaliadas a quantificação relativa das bactérias biomarcadoras. A CST mais frequente é a CST I (77%), seguida da CST IV (21%) e CST II (2%). Mulheres que apresentam infecção produtiva apresentam maior diversidade microbiana, com aumento das biomarcadoras, demonstrando que essas podem ser usadas no acompanhamento da dinâmica da microbiota e sua relação com HPV. O Kit prognóstico de câncer do colo do útero é importante no acompanhamento médico personalizado, pois permitirá intervenções no tratamento de forma precoce, promovendo saúde.

**Palavras chaves:** Microbiota vaginal, HPV, Câncer do colo do útero.

## ABSTRACT

The vaginal microbiota is a complex ecosystem formed by aerobic and anaerobic bacteria, which live in dynamic equilibrium. Factors such as immunity and hormonal variations can cause loss of balance, leading to the proliferation of opportunistic pathogens and resulting in diseases. Bacterial vaginosis (BV) is a polymicrobial disease, and may occur in association with other microorganisms, such as Human Papillomavirus (HPV). HPV is the most prevalent in the female sexually active population, being a risk factor for the development of cervical intraepithelial lesions, which may progress to cervical cancer. Some bacteria may act as biomarkers of the persistence of infection and progression of the lesion to cervical cancer. The study of these bacteria is essential to assess the prognosis of HPV positive women and reduce the mortality rate. The aim of this study was to evaluate the presence of bacteria biomarkers of persistence of HPV infection in clinically healthy women with or without HPV, proposing a predictive kit for cervical cancer. Vaginal secretion and cervical scrapings were collected (n= 66) and viral and bacterial DNA was extracted. PCR reaction for HPV genotyping was performed, as well as qPCR for biomarker bacteria. The average age of the participants was 35 years old, with a minimum age of 18 years old and a maximum age of 49 years old. It was observed that 45% of the women were white, 48% had completed high school and 47% classified their marital status as single. HPV was detected in 80% of the samples. HPV 18 was the most common (62%) in monoinfection. The frequency of co-infection with HPV 16 and 18 was 27%. In the age group of 18 to 25 years, 43% of women had HPV 16 and 18% HPV 18, and 33% had co-infection with HPV 16 and 18. The relative quantification of biomarker bacteria was evaluated. The most common CST is CST I (77%), followed by CST IV (21%) and CST II (2%). Women who have a productive infection have greater microbial diversity, with an increase in biomarkers, demonstrating that these can be used to monitor the dynamics of the microbiota and its relationship with HPV. The cervical cancer prognosis kit is important in personalized medical monitoring, as it will allow early treatment interventions, promoting health.

**Key words:** Vaginal microbiota, HPV, cervical cancer.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores, sequência, tipo viral, tamanho e gene-alvo usados no <i>Hemi- Nested-PCR</i>	39
Tabela 2	Iniciadores utilizados no qPCR	40
Tabela 3	Sondas utilizadas no qPCR	41
Tabela 4	Iniciadores utilizados no qPCR das bactérias biomarcadoras	42
Tabela 5	Características sócio-demográficas das mulheres participantes do estudo	44
Tabela 6	Características clínicas e comportamentais das mulheres participantes do estudo	45
Tabela 7	Frequência de observação de monoinfecção por HPV detectados em 26 mulheres participantes do estudo	46
Tabela 8	Análise dos genótipos virais em relação as variáveis clínico comportamentais	46
Tabela 9	Distribuição dos tipos de HPV de acordo com a faixa etária	47
Tabela 10	Mapa de Calor das comunidades bacterianas nas amostras negativas para HPV	48
Tabela 11	Mapa de calor das amostras de monoinfecção por HPV 16	49
Tabela 12	Mapa de calor das amostras de monoinfecção por HPV 18	49
Tabela 13	Mapa de calor de coinfeção por HPV 16 e 18	50
Tabela 14	Mapa de calor das amostras de lesão de ASC US	52
Tabela 15	Mapa de calor das amostras de lesão de ASC H	52
Tabela 16	Mapa de calor das amostras de LSIL	52

Tabela 17	Mapa de calor das amostras de HSIL	53
Tabela 18	Valores de referência do resultado do kit	56
Tabela 19	Interpretação do Kit de prognóstico	57

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do genoma do HPV.	23
Figura 2	Ciclo de vida do HPV. Os tipos de infecções causadas pelo vírus	26
Figura 3	Equação utilizada no método de Pfaffl	41
Figura 4	Carga viral média (Cópias /2uL) de HPV 16 e 18	47
Figura 5	Abundância relativas das bactérias biomarcadoras	51
Figura 6	Abundância relativa das bactérias biomarcadoras nas amostras de mulheres com lesão.	55

## LISTA DE SIGLAS

ASC – *Atypical squamous cells*- células escamosas atípicas

ASC H - *High grade squamous intraepithelial lesions*- Células escamosas atípicas em que não é possível excluir lesão de alto grau

ASC US – *atypical squamous cells of undetermined Significance* -Células escamosas atípicas com significado indeterminado

CIS - carcinoma *in situ*

CST – tipos de comunidades microbianas

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPV – Papilomavirus humano

HSIL - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

ICTV –Comitê Internacional de Taxonomia viral

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IST – Infecção sexualmente transmissível

LCR –*Long control region*

LSIL - *Low grade squamous intraepithelial lesions*- Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

NGS - Sequenciamento de Nova Geração

NIC - neoplasia intraepitelial cervical

NIC 2 - neoplasia intraepitelial cervical de grau 2

ORF - *Open reading frames*

pRb – retinoblastoma

SIL - Lesão intraepitelial escamosa

SUS – Sistema Único de Saúde

VB – Vaginose bacteriana

VLP- *virus like particles*

VV – Vulvovaginite

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	17
2.1 Microbiota vaginal	17
2.2 Desequilíbrio da microbiota vaginal	20
2.3 Papilomavirus humano - HPV	22
2.4 Replicação viral e efeitos citopáticos	25
2.5 Câncer cervical e lesões neoplásicas	27
2.6 Diagnóstico e rastreio de Câncer cervical	29
2.7 Técnicas moleculares para a detecção do DNA do HPV	30
2.8 Microrganismos biomarcadores preditivos na progressão do câncer	32
<b>3. OBJETIVO</b>	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivo específico	35
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	37
4.1 População amostrada	37
4.2 Coleta do espécime clínico	37
4.3 Extração de DNA das amostras de fluido vaginal e raspado cervical	38
4.4 Determinação dos genótipos virais do HPV	38
4.4.1 Amplificação da região E6/E7 do genoma viral	38
4.4.2 Genotipagem do HPV	39
4.4.3 Genotipagem do HPV por qPCR Multiplex com sondas	40

<i>TaqMan</i>	
4.5 Avaliação da ocorrência de biomarcadores da microbiota vaginal	41
4.6 Análise estatística	43
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
5.1 Características sócio-demográficas e aspectos clínicos de pacientes atendidas no serviço, de ginecologia da Prefeitura Municipal de Juiz de Fora	43
5.2 Avaliação da presença e genótipos prevalentes do vírus HPV nas amostras de raspados cervicais	45
5.3 <i>Screening</i> de bacterias biomarcadoras	48
5.4 Validação do kit prognóstico de câncer do dolo do útero	51
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>67</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO I-</b> Parecer do comitê de ética em pesquisa- UFJF	79
<b>ANEXO II</b> – Termo de consentimento livre e esclarecido	82
<b>ANEXO III</b> – Termo de consentimento livre e esclarecido (biorrepositório)	84
<b>ANEXO IV</b> – Ficha de acompanhamento clínico do SUS	86
<b>ANEXO V-</b> Requisição do exame citopatológico	87
<b>ANEXO VI</b> – Formulário coleta de dados	89
<b>ANEXO VII</b> – Valores de referência	90
<b>ANEXO VIII</b> – Valores de referência das cruzes do kit prognóstico	93

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O sistema reprodutor feminino apresenta um ecossistema complexo, no qual vive em equilíbrio dinâmico bactérias aeróbias, anaeróbias e fungos. Dentre esses microrganismos, ocorre o predomínio das bactérias do gênero *Lactobacillus*. Estes microrganismos metabolizam o glicogênio presente no epitélio estratificado vaginal produzindo ácido lático, mantendo o pH ácido, bem como produzem antimicrobianos e formam um biofilme, inibindo o crescimento de outras espécies e proporcionando proteção ao ecossistema vaginal.

O tênue equilíbrio da microbiota vaginal pode ser rompido ocasionalmente por fatores diversos, como o uso de contraceptivo, *stress*, alimentação, ciclo menstrual, uso de antimicrobianos, dentre outros; levando ao desenvolvimento de doenças, como a vaginose bacteriana. Essa doença se caracteriza por uma síndrome polimicrobiana, na qual observa-se o aumento de bactérias anaeróbias com a redução dos *Lactobacillus spp.*, promovendo a elevação do pH vaginal e levando ao aparecimento de um corrimento com odor fétido. A vaginose bacteriana muitas vezes ocorre em associação com casos de infertilidade feminina e parto prematuro, assim como com a infecção por Papilomavírus Humano (HPV).

O Papilomavírus Humano (HPV) é o vírus mais prevalente na população sexualmente ativa. Devido a uma microlesão, o vírus infecta o epitélio estratificado cervical, podendo, muitas vezes, ficar assintomático ou levar a uma infecção produtiva. Infecções persistentes por HPV podem levar a transformações celulares, que podem progredir para o câncer. Dessa forma, o HPV pode atuar como o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo do útero. Esse tipo de câncer ocupa o sétimo lugar no *ranking* mundial, e entre as mulheres brasileiras é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres. O HPV tem sido encontrado em 90% dos casos, e genótipos de HPV de alto risco oncogênico, principalmente o HPV 16 e HPV 18, tem se mostrado em associação com as alterações celulares. Estudos sugerem uma associação entre microrganismos causadores de vaginose bacteriana e o HPV, podendo levar a alterações na estrutura da comunidade microbiana vaginal em decorrência da infecção pelo HPV, e que eventualmente

podem predispor ao câncer de colo do útero ou outras doenças cervico-vaginais.

Estudos anteriores do nosso grupo sugerem alta prevalência de HPV tanto em mulheres com atipias celulares quanto em mulheres clinicamente saudáveis, sendo durante mono ou coinfeção, e evidencia a necessidade do exame preventivo para o diagnóstico precoce de alterações celulares, da vacinação e a importância do uso de preservativo nas relações sexuais. Ainda, discutiu-se a necessidade de busca de ferramentas que possam contribuir no arsenal médico para diagnóstico precoce e prognóstico dessas mulheres, além de minimização de complicações e gastos em tratamentos de remediação das complicações relacionadas à infecção pelo HPV.

Por outro lado, de acordo com a literatura recente, ao se avaliar diferentes estados fisiológicos relacionados à persistência da infecção pelo HPV, sugere-se um padrão na distribuição de alguns grupos bacterianos em diferentes situações: (i) microbiota vaginal em mulheres que apresentam a persistência da infecção por HPV; (ii) microbiota vaginal em mulheres inférteis; (iii) microbiota vaginal de mulheres com predisposição ao desenvolvimento de câncer de colo do útero relacionado à infecção por HPV; (iv) microbiota vaginal de mulheres de baixo risco de progressão para câncer de colo do útero relacionado ao HPV; (v) microbiota de mulheres sem infecção por HPV ou com baixo risco de desenvolvimento de câncer de colo do útero relacionado a infecção inicial ou subclínica por HPV.

Do exposto, sugere-se como questão central na atual proposta, o estudo da ocorrência e relação entre cargas microbianas de alguns desses grupos bacterianos como biomarcadores de prognóstico para mulheres com diagnóstico positivo para HPV. Estudar essas bactérias e suas relações de carga microbiana na coexistência com o vírus pode ser importante para melhor compreensão de riscos que levam ao desenvolvimento do câncer de colo do útero, mas principalmente, para acompanhar o prognóstico de mulheres HPV positivas que apresentam essas bactérias biomarcadoras em diferentes níveis. É proposta apresentação de uma ferramenta prognóstica baseado na distribuição de biomarcadores vaginais para acompanhamento médico personalizado, mais assertivo e rigoroso, de mulheres com infecção por HPV.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MICROBIOTA VAGINAL

A vagina apresenta, em nível histológico, três camadas: mucosa, muscular e adventícia. A camada mucosa é constituída por epitélio estratificado pavimentoso, não queratinizado, com característica descamativa, a qual residem microrganismos, tais como bactérias e fungos, que compõem a microbiota vaginal. O epitélio vaginal tem papel importante como barreira física e imunológica contra infecções, assim como a microbiota. A composição da microbiota vaginal de uma mulher saudável apresenta predominância de *Lactobacillus*. Estes microrganismos consistem na primeira linha de defesa do microambiente vaginal contra patógenos, atuando em uma relação cooperativa com o hospedeiro a fim de promover o equilíbrio, ou seja, a eubiose (WIRA; RODRIGUEZ-GARCIA; PATEL, 2016).

Técnicas moleculares permitiram uma melhor compreensão dessa microbiota, estabelecendo tipos de comunidades microbianas (CSTs), baseada na composição e abundância das espécies bacterianas vaginais. Essas CSTs foram classificadas em 5 tipos: CST I, na qual ocorre prevalência de *Lactobacillus crispatus*, CST II, com abundância de *L. gasseri*, CST III, de *L. iners*, CST IV, com redução de *Lactobacillus* e aumento de bactérias anaeróbias, e CST V, de *L. jensenii*. Entretanto, CST IV foi dividida em dois grupos: CST IV-A, que apresenta os microrganismos *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Fingoldia* e *Streptococcus* e CST IV-B, com a presença de *Atopobium*, *Gardnerella*, *Sneathia*, *Mobiluncus* e *Megasphaera* (CHEE; CHEW; THAN, 2020; KALIA; SINGH; KAUR, 2020; MITRA, A *et al.*, 2015; PLESNIARSKI; SIDDIK; SU, 2021).

De acordo com os estudos de RAVEL e colaboradores (2011), mulheres que apresentam a microbiota da CST I apresentam uma maior proteção contra patógenos, uma vez que *L. crispatus* apresentam maior produção de ácido láctico. Entretanto, *L. iners*, embora presente em um ambiente saudável, pode ser verificado em um ambiente vaginal durante um processo infeccioso, sendo

muitas vezes encontrado em associação com a infecção por HPV (CHEE; CHEW; THAN, 2020; MITRA, A *et al.*, 2015). Em contrapartida, a CST IV é caracterizada pelo desequilíbrio do microambiente vaginal, uma vez que ocorre a perda da proteção dos lactobacilos, devido sua depleção, com aumento de bactérias oportunista e patogênicas, levando a ocorrência de infecções vaginais conhecidas como vulvovaginites (VV), em especial a vaginose bacteriana (VB) (DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2016; MITRA *et al.*, 2016).

Os *Lactobacillus* produzem substâncias antimicrobianas, como o ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, além de formar um biofilme, protegendo o tecido vaginal (DELGADO-DIAZ *et al.*, 2020). Essas bactérias se aderem as células do epitélio vaginal devido a adesinas que se conectam a receptores celulares específicos, impedindo o crescimento de outros microrganismos (MARTÍN *et al.*, 2008).

O ácido láctico é produzido como resultado da fermentação de carboidratos, haja vista que o tecido do epitélio vaginal é rico em glicogênio. Essa acidificação é importante para evitar a proliferação de potenciais patógenos (DELGADO-DIAZ *et al.*, 2020). Estudos indicam que o ácido láctico é responsável por inibir infecções por microrganismos como *Chlamydia trachomatis*, Herpes simplex vírus tipo 2 (HSV-2), HIV, HIV-1 e uma ampla gama de microrganismos associados à VB (GONG *et al.*, 2014; ÑAHUI PALOMINO *et al.*, 2017; O'HANLON; MOENCH; CONE, 2011). O ácido láctico ainda atua potencializando a produção de citocinas pró-inflamatórias protetoras, realizando ativação de linfócitos T Helper 17, culminando na produção de interferon (KWASNIEWSKI *et al.*, 2018).

As bacteriocinas são proteínas antimicrobianas, como peptídeos, que podem atuar como bactericidas ou podem ter ação inibitória (OJALA *et al.*, 2014).

O peróxido de hidrogênio é um potente microbicida, devido a atividade oxidante pela produção de espécies reativas de oxigênio, que danificam a integridade do DNA celular, inibindo o crescimento de microrganismos não produtores de catalase (BROTMAN *et al.*, 2014; MARTÍN *et al.*, 2008). Entretanto, sua ação no microambiente vaginal tem sido discutida. De acordo

com os estudos de VALLOR e colaboradores (2001), os níveis de O<sub>2</sub> dissolvidos na vagina são baixos, então a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulados no ambiente não seria satisfatória para fornecer toxicidade aos patógenos. Outro estudo de O'HANLON; MOENCH; CONE, (2011) demonstrou que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não teve efeito contra patógenos relacionados a VB, e ainda, que níveis elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seriam prejudiciais aos próprios *Lactobacillus*, em detrimento às bactérias da VB. Enfim, o papel dessa substância na proteção do ambiente vaginal ainda é discutível.

Em um microambiente vaginal saudável ainda são encontradas outras espécies bacterianas, em menor proporção, como *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria* spp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium* spp., *Peptoestreptococcus* sp., *Prevotella*, *Clostridium*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Ureaplasma urealyticus*, *Listeria* e *Mobiluncus* spp., dentre outras; assim como fungos do gênero *Candida*. Em condições de desequilíbrio, tanto as bactérias quanto os fungos, podem causar doenças quando ocorre a redução de lactobacilos. Assim, o microambiente vaginal passa a ser profícuo para determinadas espécies, favorecendo o crescimento das mesmas (BROTMAN *et al.*, 2011; NARDIS; MOSCA; MASTROMARINO, 2013).

Mudanças na composição da microbiota vaginal podem ocorrer em diferentes fases da vida, com diferenças marcantes na infância, na qual predominam bactérias Gram-negativas anaeróbias, como as dos gêneros *Fusobacterium* e *Bacteroides*, além de Gram positivos anaeróbios como *Peptococcus* e *Peptostreptococcus* (MITRA *et al.*, 2016). Na puberdade, se inicia a produção do hormônio estrogênio, que promove espessamento do epitélio vaginal com conseqüente aumento de glicogênio, o que favorece a ocorrência de *Lactobacillus*, levando-os a serem predominantes até a menopausa. Na menopausa, com a redução do hormônio, verifica-se o retorno de uma microbiota mista (GAJER *et al.*, 2012; PETROVA *et al.*, 2013).

Além das fases da vida, a microbiota vaginal pode sofrer alterações devido a fatores externos, como o uso de anticoncepcional, prática de ducha

higiênica, uso de antimicrobianos, alimentação, e ainda fatores internos, como gravidez, estado de saúde, emocional, alterações hormonais, dentre outros (CHEE; CHEW; THAN, 2020; DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2016). Estes fatores podem romper com o equilíbrio da microbiota vaginal, culminando na proliferação de microrganismos causadores de doenças (CUNHA *et al.*, 2017).

## 2.2 DESEQUILÍBRIO DA MICROBIOTA VAGINAL

O desequilíbrio no microambiente vaginal pode gerar uma patologia denominada vulvovaginite (VV), que pode levar ao favorecimento do crescimento de microrganismos ou a introdução de patógenos. Tem como principais características a sensação de queimação, prurido intenso, eritema e dor. Dependendo de sua etiologia, a VV pode ser dividida em candidíase, tricomoníase e vaginose bacteriana (CUNHA *et al.*, 2017).

A tricomoníase decorre da introdução de um patógeno, o protozoário *Trichomonas vaginalis*. É considerada uma infecção sexualmente transmissível (IST) (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

A candidíase é uma das principais causas de reclamações nos consultórios ginecológicos. Apresenta um corrimento esbranquiçado, associado a inflamação vaginal e vulvar, devido a proliferação de leveduras do gênero *Candida* (FOXMAN *et al.*, 2013; RANDELOVIĆ *et al.*, 2012). A *Candida albicans* é a principal espécie causadora dessa enfermidade; podendo causar candidíase em 75% das mulheres pelo menos uma vez na vida (CHEE; CHEW; THAN, 2020). Em populações susceptíveis, a candidíase pode ser recorrente, principalmente por *Candida glabrata*, com quatro ou mais episódios durante o ano (CUNHA *et al.*, 2017; NAGASHIMA; YAMAGISHI; MIKAMO, 2016).

A vaginose bacteriana (VB), também comum na população feminina, é caracterizada por mudanças significativas na composição da microbiota, com alteração da dominância de *Lactobacillus*, favorecendo um ambiente polimicrobiano. Podem ser encontradas espécies de *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp.,

*Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* sp., *Fusobacterium* sp., *Ureaplasma urealyticum*, *Megasphaera* spp., *Leptotrichia* spp., *Clostridium*, *Dialister* spp., *Streptobacillus* spp., *Chloroflexi* spp., *Olsenella* spp., *Porphyromonas asaccharolytica*, *Shuttleworthia* spp. e *Eggerthella hongkongensis* (CHEE; CHEW; THAN, 2020).

O aumento destes microrganismos promove a elevação do pH vaginal, uma vez que o número de lactobacilos reduz, perdendo o seu caráter protetor (LING *et al.*, 2010; RAVEL, JACQUES; BROTMAN; *et al.*, 2013; SHIPITSYNA *et al.*, 2013). Ao se proliferarem, essas bactérias promovem a degradação do muco, uma vez que produzem proteases, destruindo a barreira química que protege o epitélio vaginal e cervical (MITRA *et al.*, 2015). Devido ao metabolismo das mesmas, são produzidas aminas com odor desagradável (putrescina e cadaverina) (FAURE *et al.*, 2016; MALAGUTI *et al.*, 2015; MASTROMARINO; VITALI; MOSCA, 2013; MORENA; SANTOS, 2014). Na vaginose bacteriana, verifica-se o surgimento de um corrimento vaginal com odor fétido, podendo ter colorações diversas, ou ser esbranquiçado, amarelado ou acinzentado. De acordo com o grau de infecção e dos microrganismos encontrados, a secreção pode ser discreta ou abundante, pode vir acompanhada de prurido e ardência; entretanto, uma parcela substancial de mulheres afetadas podem ser assintomáticas (ONDERDONK; DELANEY; FICHOROVA, 2016; RAVEL, JACQUES; BROTMAN; *et al.*, 2013).

Alterações na composição da microbiota também podem estar relacionadas com a infertilidade das mulheres, sendo este um dos maiores problemas de saúde pública atualmente. Estima-se que um em cada seis casais apresentará problemas de fertilidade durante a vida reprodutiva (OLIVEIRA; MEDEIROS; ELEUTÉRIO JUNIOR, 2019). Estudos anteriores verificaram associação entre VB e infertilidade, e demonstraram que mulheres inférteis apresentaram prevalência de VB três vezes maior em comparação com o grupo controle (OLIVEIRA; MEDEIROS; ELEUTÉRIO JUNIOR, 2019; ØVESTAD *et al.*, 2010). HAGGERTY e colaboradores (2016) encontraram as bactérias *Atopobium vaginae* e *Sneathia sanguinegens* na microbiota de mulheres inférteis, sugerindo que esses microrganismos possam ser utilizados como biomarcadores da saúde do trato genital feminino.

A VB ainda representa um fator de risco para aquisição de IST's, como HIV, HPV, gonorréia (*Neisseria gonorrhoeae*), tricomoníase e sífilis (*Treponema pallidum*), bem como risco para doenças inflamatórias pélvicas (DIP), endometrite e pode ainda levar ao aborto e parto prematuro (USYK *et al.*, 2020). A VB apresenta um componente psicológico e social, uma vez que gera constrangimento a mulher, devido a um odor desagradável, que leva a paciente e as pessoas a seu redor a acreditarem se tratar de falta de higiene (ALVES *et al.*, 2014; BARRETO ALVES *et al.*, 2016).

A vaginose bacteriana frequentemente pode estar associada à infecção por HPV, e estudos relatam maior prevalência da infecção viral em mulheres que apresentam essa doença (USYK *et al.*, 2020).

Em contrapartida, mulheres com predominância de *L. crispatus* apresentaram menor relação com a prevalência da infecção por HPV (USYK *et al.*, 2020).

### 2.3 Papilomavírus humano – HPV

Uma das infecções sexualmente transmissíveis (IST's) de maior prevalência entre a população jovem sexualmente ativa é causada pelo Papilomavírus Humano (HPV). Esse vírus infecta a maioria das mulheres em todo o mundo, sendo essas portadoras de pelo menos 1 tipo viral ao longo da vida. Muitas vezes, a infecção é encontrada em associação com a VB ou outras infecções virais, como o vírus da imunodeficiência humana – HIV (INCA (2016); MUÑOZ, NUBIA *et al.*, 2006).

Os Papilomavírus pertencem a família *Papillomaviridae*, onde está descrita a espécie *Human Papillomavirus* (DOORBAR *et al.*, 2012). Esse grupo apresenta 16 gêneros, sendo o principal o *Alphapapillomavirus*, no qual estão inseridos 90% dos HPVs. São reconhecidos mais de 200 tipos de HPV, sendo aproximadamente 40 relacionados ao epitélio genital (WOODMAN *et al.*, 2007).

O HPV é composto por DNA fita dupla circular com aproximadamente 8000 pares de base (pb) e massa de 5.000 KDa, representando cerca de 12% da massa viral, inseridos em um capsídeo esférico. Devido à ausência de um envelope, o vírus é relativamente estável e resistente à dessecação, mantendo-se viável no meio extracelular por até uma semana (DOORBAR *et al.*, 2012). O vírus segue uma simetria icosaédrica, e possui diâmetro de 55 nanômetros (nm), que compreende 72 capsômeros (DUENSING; MÜNGER, 2002).

A informação do genoma viral (figura 1) está distribuída em duas regiões codificantes, que compreendem as sequências de leitura aberta (*Open reading frames* – ORF), classificadas de acordo com suas expressões temporais, conhecidas como precoce ou *Early* (E), relacionada a proteínas não estruturais e região tardia ou *Late* (L), que codifica as proteínas estruturais. Além das regiões codificantes, existe a região reguladora, (*Long control region* – LCR), também conhecida como URR (*Upstream regulation region*), que não apresenta ORF's e são responsáveis por controlar os processos de replicação e transcrição viral (MUÑOZ, NUBIA *et al.*, 2006).

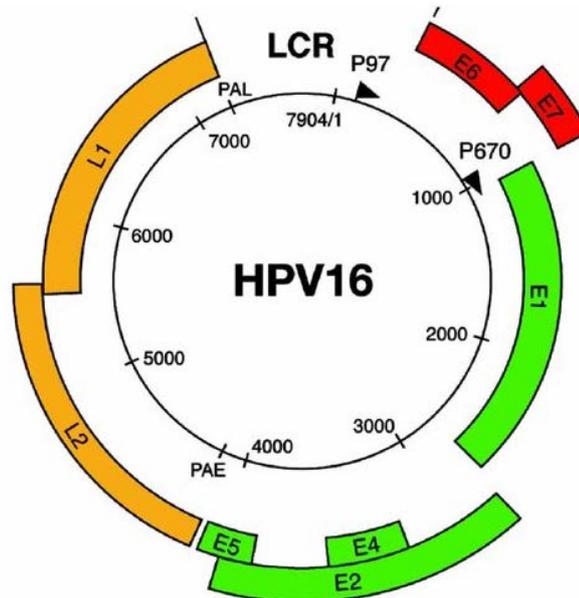


Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV (DOORBAR *et al.*, 2012).

A região precoce ou *Early* (E) codifica proteínas regulatórias (E1, E2, E4, E5, E6, E7), que recebem o nome do gene de que são produzidas, estas promovem a regulação da expressão gênica viral, transcrição, replicação e a transformação celular, ou seja, executando as funções regulatórias vitais para a produção da progênie viral (DUENSING; MÜNGER, 2002).

O gene *E1* codifica a fosfoproteína E1, que apresenta atividade de helicase dependente de adenosina – trifosfato (ATP), se conecta a regiões ricas em AT e contém domínios de ligação à proteína E2. A proteína E2 apresenta três domínios funcionais que regulam a transcrição e executam funções na replicação; ocasionalmente pode vir a se conectar ao LCR e reprimir as proteínas E6 e E7. Em células com transformação maligna, a região *E1/E2* se transforma devido a integração do vírus no genoma do hospedeiro, e assim a regulação das proteínas E6 e E7 torna-se sem efeito (MUÑOZ *et al.*, 2006). A proteína E4 ainda se encontra em estudo, sua função não está definida, mas acredita-se que esteja relacionada a liberação dos vírus da célula, ao induzir o colapso da rede de citoqueratina celular, ou seja, promovendo modificações citoplasmáticas e perturbações no citoesqueleto celular (WOODMAN *et al.*, 2007).

As proteínas E5, E6 e E7 são oncogênicas, pois possuem a capacidade de induzir a imortalização e transformação celular. A função da proteína E5 é aumentar o poder de transformação maligna da proteína E7, estimulando o crescimento celular e inibindo a expressão do gene supressor de tumor *p21*. As proteínas E6 e E7 tem a capacidade de alterar o controle do ciclo celular e promover uma instabilidade genômica, uma vez que ao se ligarem às proteínas reguladoras do ciclo celular estimulam o mesmo a progredir. A E6 se liga a proteína p53, degradando-a, impedindo, assim, a inibição do crescimento celular e apoptose. Já a E7 inativa a proteína do retinoblastoma – pRb - regulando-a negativamente, impulsionando os genes da fase S, culminando com a perda do controle do ciclo celular e o desenvolvimento de tumores. Juntas, as proteínas promovem uma regulação negativa (*down regulation*) de genes que expressam interferon, limitando a resposta imune do hospedeiro à infecção (MOODY; LAIMINS, 2010; STEENBERGEN *et al.*, 2014; THOMAS *et al.*, 2008; WOODMAN *et al.*, 2007).

As ORF's E3 e E8 foram identificadas, mas elas não são uniformemente distribuídas na família do *Papillomaviridae*, sendo encontradas na minoria dos vírus, como por exemplo, nos BPVs (do inglês *Bovine Papillomavirus*) e não apresentam função definida (DOORBAR *et al.*, 2012).

A região tardia ou *Late* (L) apresenta as ORF L1 e L2, que codificam proteínas de mesmo nome, importantes na tradução das grandes e pequenas proteínas do capsídeo, ou seja, apresentam função estrutural (HORVATH *et al.*, 2010; RODEN; WU, 2006; SCHILLER; DAVIES, 2004).

## 2.4 Replicação viral e efeitos citopáticos

O vírus penetra no epitélio através de microlesões que ocorrem comumente durante o intercuro sexual, atingindo a camada basal (MOODY; LAIMINS, 2010; MUÑOZ, N *et al.*, 2009). Se ligam a células por meio da proteína L1, utilizando os receptores glicosaminoglicanos de heparan sulfato. A internalização ocorre por endocitose, de forma lenta, mediada por clatrina e caveolina, proteínas que atuam na conformação do citoesqueleto, modificando-o para a formação das vesículas (HORVATH *et al.*, 2010).

O ciclo de replicação desse vírus depende da diferenciação celular. A medida que as células se dividem e migram em direção a superfície, se diferenciam, e assim os vírus vão sendo distribuídos entre as células filhas. Parte dessas células permanecem na camada basal atuando como reservatório para o DNA viral, na forma episomal (MUÑOZ, N *et al.*, 2009; MUÑOZ, NUBIA *et al.*, 2006).

O HPV pode promover infecção crônica ou persistente, produtiva, nas quais expressam proteínas diferenciadas. Na infecção crônica, o DNA viral permanece sob a forma episomal, assintomático, por longos períodos. Nesse momento, o genoma viral pode permanecer como um elemento extracromossomal no núcleo celular, replicando conjuntamente com o DNA do hospedeiro, sendo coordenada pelas proteínas E1 e E2 (GALLO *et al.*, 2003). Ocasionalmente, o genoma viral pode ser ativado, levando a uma infecção

produtiva, com replicação viral. Em uma infecção produtiva, o DNA viral pode se integrar ao genoma humano, levando a transformações neoplásicas. Os dois tipos de infecção podem ocorrer concomitantemente, conforme figura 2 (INCA 2016; ZUR HAUSEN, 2009).

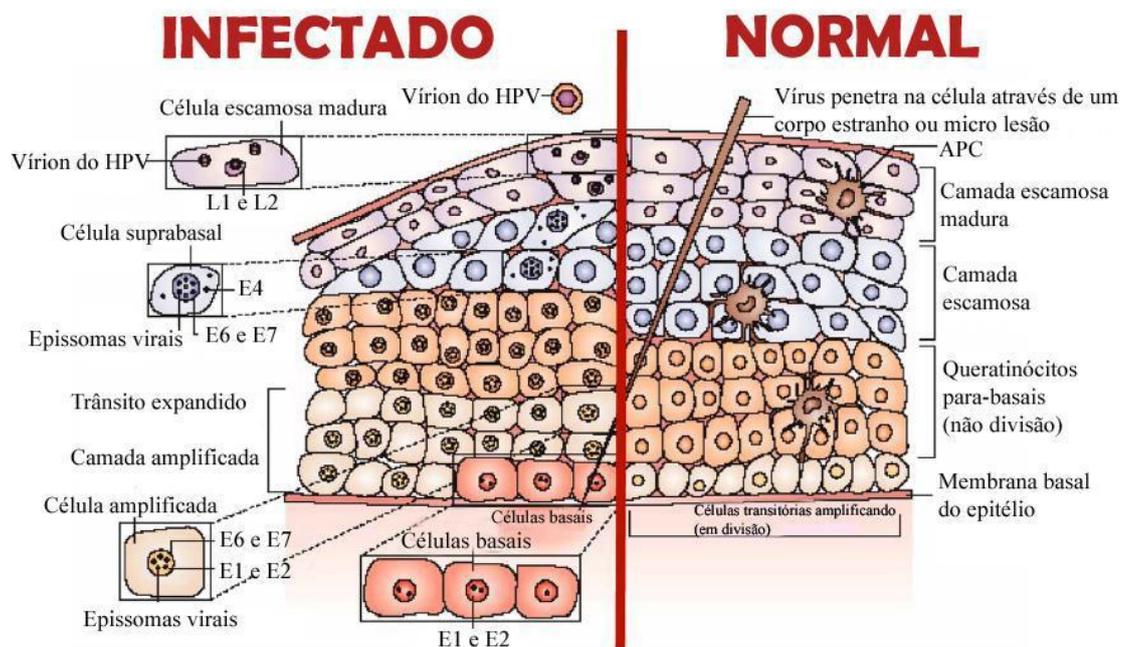


Figura 2: Ciclo de vida do HPV. Os tipos de infecções causadas pelo vírus. Adaptado de MUÑOZ, N *et al.*, (2009).

Nas camadas basais e parabasais ocorre a replicação, e nas camadas superiores, ocorre a formação do capsídeo viral. O HPV não possui ciclo lítico, portanto, a liberação das partículas virais acontece na superfície do tecido, que tem característica descamativa (ARBYN, MARC *et al.*, 2006; DILLNER *et al.*, 2011).

Infecções persistentes podem levar a perda do controle da replicação viral, com quebra da integridade do DNA humano e consequente integração do DNA viral ao DNA do hospedeiro. Esta integração promove a linearização entre os genes *E1* e *L1* e a inativação de *E2*, por ruptura ou deleção. A proteína *E2* é responsável pela regulação da expressão exacerbada dos genes. Assim, ocorre a super expressão dos genes virais, incluindo *E6* e *E7*, relacionados

com a transformação celular, acelerando a formação do câncer (GALLO *et al.*, 2003; STEENBERGEN *et al.*, 2014).

As proteínas E6 e E7 de HPVs oncogênicos possuem a capacidade de interferir no controle do ciclo celular, uma vez que formam complexos com as proteínas p53 e pRB, respectivamente, inativando-as. A inativação dessas proteínas causa transtornos no ciclo celular, impedindo processos de reparação do DNA, promovendo instabilidade genética, acúmulo de mutações e imortalização das células, culminando com o desenvolvimento de neoplasias (DILLNER *et al.*, 2011)

## 2.5 Câncer cervical e lesões neoplásicas

A infecção persistente por HPV, principalmente os tipos de alto risco, assim como a ocorrência de coinfeções por vários tipos virais, atuam como cofatores para o desenvolvimento de alterações celulares que podem levar ao câncer cervical (CC), também chamado de Câncer de colo do útero (Cohen *et al.*, 2019). Os tipos de HPV 16 e 18 são os mais prevalentes na população mundial, e, conseqüentemente, são encontrados em 70% dos casos dessa enfermidade (DE SANJOSÉ *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2013; WAGNER *et al.*, 2015). Outros tipos também apresentam alta incidência, sendo os HPVs 31, 33, 35, 45, 52, e 58, os mais comuns e os HPVs 39, 51, 56 e 59 com menor incidência em casos de CC (MAHMOODI *et al.*, 2018). Sozinho, o HPV 16 é responsável por 60% dos cânceres e 50% das lesões pré-cancerosas (WANG *et al.*, 2020). No Brasil, os tipos virais de maior incidência nos casos de CC são: HPV 16 (52,8%), 18 (15,4%), 45 (5%), 33 (4,8%), 31 (4,6%), 35 (3,9%), 58 (2,2%), 52 (1,7%), 51 (1%) e 39 (1%) (HPVCENTER; HPVCENTER, 2021).

A infecção por HPV pode se tornar um estímulo para inflamação crônica do tecido, uma vez que a proteína viral E5 estimula a secreção de prostaglandinas e seus receptores e a proteína E7 induz a produção de interleucina 1 $\beta$ . Ou seja, a infecção pode estimular fatores que competem na

promoção do câncer, haja vista evidências que sugerem que ambientes de irritação crônica e infecção podem ser um fator crítico para o desenvolvimento de tumores (ADEFUYE; SALES, 2012; FERNANDES *et al.*, 2015).

No entanto, o HPV sozinho não representa a causa de alterações que culminam no CC, para isso são necessários cofatores, tais como: idade, início da atividade sexual, uso de anticoncepcional, tabagismo, dentre outros fatores relacionados a saúde do paciente (COHEN *et al.*, 2019).

O câncer é uma doença de evolução lenta e progressiva, que ocorre por estágios. Se manifesta inicialmente através de lesões precursoras que podem se desenvolver e levar a um quadro grave de câncer invasivo, quando atravessa a membrana basal (MUÑOZ, N *et al.*, 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, no ano de 2020, 600 mil mulheres tiveram o diagnóstico de câncer cervical, sendo que 342 mil morreram (LIU *et al.*, 2021). No Brasil, as estimativas do triênio 2020-2022 são de 16590 novos casos. O câncer de colo do útero é um dos mais frequentes na população feminina, ocupando a quarta posição na região sudeste do país (INCA, 2015). Entre as brasileiras, representa o terceiro tipo de câncer mais comum na população feminina entre 15 e 44 anos (HPVCENTER, 2021).

O controle do CC baseia-se no exame preventivo citológico e colposcópico, que rastreia alterações, que se iniciam por lesões precursoras, como Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (*Low grade squamous intraepithelial lesions* – LSIL) que anteriormente era classificada como neoplasia intraepitelial cervical de grau 1 (NIC I), terminologia proposta pelo Sistema de Bethesda. Esse sistema dividiu ainda Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (*High grade squamous intraepithelial lesions* – HSIL), compreendendo NIC II e NIC III (VERMA, 2014). As atipias celulares foram classificadas em células escamosas atípicas (*Atypical squamous cells* - ASC), subdivididas em: aquelas com significado indeterminado (*Atypical squamous cells of undetermined significance* - ASC-US) e aquelas em que não é possível excluir lesão de alto grau (*Atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion* - ASC-H). A designação destas atipias engloba processos

indeterminados, podendo estar relacionado ao HPV ou a inflamações (VALIYA; BAXI, 2015).

O câncer de colo de útero é uma doença tratável, e seu diagnóstico pode ser realizado após exames preventivos precoces, com consequentemente redução da taxa de mortalidade, sendo a abordagem preventiva a ação mais eficiente (INCA, 2015; INCA, 2016).

## **2.6 Diagnóstico e rastreio de Câncer cervical**

O diagnóstico de CC, assim como o rastreamento, é realizado através do emprego dos métodos rotineiros, como o teste de Papanicolaou, conhecido como exame preventivo (ZUNA *et al.*, 2007; BOBEK *et al.*, 2010). É um procedimento que permite detectar alterações pré-cancerosas nas células cervicais, baseando-se em propriedades de cor e forma de núcleos celulares e citoplasma. O diagnóstico precoce pode reduzir a mortalidade por câncer em até 80% (WILLIAM *et al.*, 2018). Sendo a principal estratégia de rastreio, esse teste normalmente é realizado uma vez ao ano, através da coleta de material citológico seguido de análise citopatológica, permitindo assim, determinar se existem alterações citológicas (SAFAEIAN; SOLOMON; CASTLE, 2007). Caso existam alterações, seguem-se exames de colposcopia e de histopatologia, para melhor análise e definição da lesão encontrada (INCA, 2016).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2016), o exame deve ser realizado em mulheres de 25 a 64 anos; uma vez ao ano, após dois exames consecutivos com resultado normal ou negativo, o teste pode ser realizado a cada três anos.

Entretanto, o teste de Papanicolaou apresenta algumas desvantagens, como o tempo consumido para o procedimento e posterior análise, mas principalmente a necessidade de um citologista treinado, a fim de evitar erros de classificação visual, assim como a importância de uma coleta adequada (WILLIAM, 2018; ZUNA *et al.*, 2007; BOBEK *et al.*, 2010).

A colposcopia permite a visualização do colo uterino através das lentes do colposcópio, com aumento de 10 a 40 vezes. O resultado é importante para

o direcionamento da biópsia. O exame histológico é considerado o padrão ouro no diagnóstico morfológico, no qual a amostra é coletada por meio de biópsia, permitindo verificar a presença de alterações celulares, como a coilocitose - células com grandes vacúolos perinucleares; disqueratose - queratinização imperfeita das células epidérmicas; e discoriose - aumento e irregularidade na forma dos núcleos e hiperchromatismo (BRASIL, 2022).

Os testes moleculares para detecção do DNA do HPV e tipagem viral podem complementar o diagnóstico, entretanto, não fazem parte da rotina clínica (ARBYN *et al.*, 2010).

## **2.7 Técnicas moleculares para a detecção do HPV**

A detecção do HPV pode ser realizada em amostras clínicas através de métodos moleculares. A escolha da metodologia depende da disponibilidade de recursos e infraestrutura adequadas, apresentando alto grau de especificidade e sensibilidade, principalmente quando comparada aos métodos citológicos e histológicos, usados na rotina médica (ARBYN *et al.*, 2010).

As técnicas moleculares são importantes, uma vez que identificam o genótipo viral, possibilitando uma triagem mais específica com acompanhamento personalizado de acordo com o tipo viral encontrado, auxiliando no prognóstico da doença (MARTINS; OLIVEIRA; *et al.*, 2016).

As principais técnicas moleculares no diagnóstico de HPV são a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Hibridação *In Situ* com fluorescência - FISH, *microarrays*, Captura Híbrida, e sequenciamento de nova geração (NGS) (MARTINS; MENDES DE OLIVEIRA; *et al.*, 2016).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada, que apresenta alta especificidade, variando de 92,8% a 100% na detecção do HPV. Esse método consiste na amplificação de uma sequência específica de DNA em um curto espaço de tempo (MARTINS; MENDES DE OLIVEIRA; *et al.*, 2016). Para a determinação da carga viral, é utilizada a técnica de PCR em tempo real (qPCR), que utiliza sondas fluorescentes que podem ser quantificadas à medida que a amplificação vai ocorrendo, sendo diretamente

proporcional à quantidade de amplicons gerados (WATERS, 2013; YAMAGUCHI *et al.*, 2002; FU *et al.*, 2015; CUSCHIERI *et al.*, 2016)).

A técnica de hibridização *in situ* (ISH) se baseia na hibridização (ligação) de uma sonda específica, para um tipo de HPV, em uma lâmina com tecido previamente tratados com tampões. Os híbridos que se formam entre a sonda marcada e as sequências alvo específica podem ser visualizadas e detectados por microscopia. A detecção do HPV ocorre no núcleo de células infectadas, o que permite identificar a localização do DNA viral. A presença de HPV em amostras de tecido sendo testadas é indicada pelo desenvolvimento de precipitado dentro dos núcleos das células epiteliais, e a condição do vírus pode ser classificada como integrada ou episomal pela presença de sinais pontuais e sinais difusos, respectivamente. Entretanto, essa técnica apresenta baixa sensibilidade e demanda muito tempo para ser realizada (WILLIAMS; KOSTIUK; BIRON, 2022).

A captura híbrida é um teste de hibridização molecular, na qual ocorre a amplificação dos híbridos formados (sinal) que serão detectados por reação enzima substrato e leitura através da quimioluminescência. É a única técnica molecular aprovada pelo Food and Drug Administration - FDA e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2002). Inicialmente ocorre a desnaturação do DNA da amostra, depois é adicionado uma mistura de sondas específicas para vários tipos virais. Estas sondas mistas detectam dois grupos de HPV: tubo A, os genótipos de HPVs de baixo risco e tubo B os genótipos de HPV de alto risco. A técnica de captura híbrida distingue o grupo A e B, mas não o tipo viral. O resultado é capturado por uma placa de microtitulação revestida com anticorpos monoclonais de captura. Em seguida, ocorre a adição de um segundo anticorpo ligado a fosfatase alcalina, que resulta na liberação de luz, que será captada por um sistema quimioluminescente (WILLIAMS; KOSTIUK; BIRON, 2022).

O sequenciamento do 16S rDNA é uma ferramenta eficaz no estudo de comunidades microbianas; assim como sequenciamento de DNA para o diagnóstico de HPV, uma vez que permiti identificar a sequência de bases do DNA que compõe o genoma. De modo geral, o conteúdo de um genoma possibilita determinar funções dos genes, identificar genes relacionados a

doenças, genotipagem, estudos de comparação de genomas para a compreensão da evolução das espécies e identificação de microrganismos presentes no microambiente vaginal humano (MARDIS, 2011; NELSON, 2014).

O Sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing - NGS) tem sido cada vez mais utilizado, podendo sequenciar todo o genoma do HPV ou ser limitado a áreas específicas de interesse (PERES *et al.*, 2015). Permite inferir dados relevantes que vão além de presença e ausência viral, haja vista que possibilita a genotipagem, inclusive sendo um método altamente sensível, que detecta um baixo número de cópias, incluindo também novos tipos virais e fornecendo informações mais detalhadas sobre o curso provável da doença.

A constatação de que o HPV está relacionado a carcinogênese permite uma nova abordagem para a prevenção do CC, a partir da detecção e genotipagem viral, assim como outros fatores que levam a persistência da infecção viral, como a coinfeção com bactérias causadoras de VB. A detecção de determinadas bactérias que estão relacionadas à infecção por HPV é uma ferramenta emergente e importante para determinar o prognóstico da doença, levando a um acompanhamento médico personalizado, otimizando protocolos abordados pelo sistema de saúde (MÜHR *et al.*, 2021).

## **2.8 Microrganismos biomarcadores preditivos na progressão do câncer**

Segundo o National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group, biomarcador é um parâmetro biológico que pode ser mensurado e avaliado, podendo ser usado para analisar processos biológicos normais, patogênicos ou respostas a uma intervenção ou exposição terapêutica (STRIMBU; TAVEL, 2010). Eles auxiliam na identificação de populações que apresentam maior probabilidade de se beneficiar de determinado tratamento. Os biomarcadores relacionados ao câncer de colo do útero são pesquisados com intuito de avaliar o risco de um indivíduo desenvolver neoplasia, assim como detectar estágios tumorais e prognóstico da doença (CALIFF, 2018). A utilização de biomarcadores tem finalidade de reduzir índices de casos graves

e mortes, promovendo diagnóstico precoce e um acompanhamento mais individualizado, uma vez que estes biomarcadores podem indicar probabilidades de desenvolvimento da doença (ROBB; MCINNES; CALIFF, 2016).

Biomarcadores relacionados ao prognóstico tem como objetivo a verificação da probabilidade de ocorrer determinado evento, assim como ocorrência de recidiva ou a progressão de doenças, como por exemplo, mudança de lesões pré-cancerosas para o câncer cervical (CALIFF, 2018). Nesse caso já houve um diagnóstico, mas é necessário um acompanhamento, a fim de verificar mudanças no quadro da doença que podem levar a piora da mesma, haja vista que esse indivíduo pode não apresentar doença aparente, sendo classificado como clinicamente saudável, sendo, portanto uma avaliação individual (ROBB; MCINNES; CALIFF, 2016).

Ainda obstante a redução da taxa de mortalidade devido ao CC, verifica-se um número elevado de novos casos, revelando a necessidade de novas abordagens para a compreensão dos processos que promovem alterações celulares, mas principalmente quais são os fatores que permitem a progressão de lesões cervicais (ROBB; MCINNES; CALIFF, 2016).

Na literatura observa-se que existem biomarcadores já bem estabelecidos, relacionados ao prognóstico de diferentes tipos de câncer. No câncer de mama, observa-se a expressão do receptor de estrógeno e receptor HER2, que indicam um melhor prognóstico para os pacientes (LUDWIG; WEINSTEIN, 2005). No câncer de vulva e outros associados a infecção por HPV, observam-se as proteínas p53 e p16, sendo fatores importantes na decisão quanto a terapia direcionada (SAND *et al.*, 2019). No câncer cervical, o antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC Ag), bem como CA19-9 têm sido utilizado para monitorar e detectar esse tipo de câncer, assim como microRNAs (miRNAs), sugeridos como biomarcadores para a detecção do câncer cervical, apresentando alta sensibilidade e especificidade (DU *et al.*, 2020).

Uma maior compreensão da dinâmica da microbiota vaginal associada a infecção por HPV é de extrema importância para avaliação prognóstica dos

pacientes, o que leva a uma terapia mais assertiva. Esse processo pode ser realizado por meio de biomarcadores relacionados a essa dinâmica, utilizando as bactérias presentes no microambiente vaginal, e através de seu estudo pode-se compreender fatores que levam a mudança e culminam com o desenvolvimento de câncer (DU *et al.*, 2020).

A coinfeção de HPV e de determinados microrganismos acentua a persistência da infecção por HPV e conseqüentemente o risco de carcinogênese do mesmo, devido a alterações no tecido epitelial (BAHRAMI *et al.*, 2018; USYK *et al.*, 2020). Diante de inflamações, o tecido perde a barreira protetora física do mesmo e também acentua alterações na replicação e na transcrição viral. Assim, o desequilíbrio na microbiota vaginal é favorável a aquisição e persistência da infecção por HPV (SO *et al.*, 2020).

Um estudo de CHAO e colaboradores (2019) avaliou 151 mulheres, as quais 65 eram HPV positivas e 86 HPV negativas, e revelou que o HPV está fortemente associado a maior abundância de bactérias anaeróbias, características da CST IV, como *Prevotella*.

Segundo LEE e colaboradores (2013), mulheres infectadas por HPV apresentaram maior abundância de *Prevotella*, *Sneathia*, *Atopobium*, *Anaerococcus*, *Dialister*, *Gardnerella*, entre outras bactérias características da CST IV, quando comparadas com mulheres que apresentam microbiota saudável.

Em suma, o desequilíbrio da microbiota está fortemente associado ao risco da infecção por HPV. Análise de sequenciamento revelou que *G. vaginalis* foi identificada como biomarcador chave relacionado a NIC 2, haja vista que a bactéria além de influenciar o desenvolvimento da lesão, ainda promove aumento da diversidade microbiana (USYK *et al.*, 2020). Essa por sua vez pode formar um biofilme, acentuando os fatores de risco para o desenvolvimento das lesões (LOUIS; HOLD; FLINT, 2014; SFANOS *et al.*, 2018). A medida que a lesão progride, formam-se outras associações microbianas, o que pode ser observado no trabalho de ØVESTAD e colaboradores (2010), que ao analisar as biópsias cervicais, verificou diferenças microbianas a medida que ocorria a progressão do CC.

Assim, a compreensão da dinâmica da microbiota vaginal, bem como a detecção do Papilomavirus humano em amostras de secreção vaginal de mulheres é fundamental para a geração de dados, conhecimento que levarão ao entendimento dos fatores que contribuem para a mudança na estrutura da comunidade bacteriana que eventualmente predispõe ao câncer do colo do útero ou outras doenças.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a distribuição de bactérias biomarcadoras na microbiota vaginal de mulheres com diagnóstico positivo para infecção por HPV atendidas nos serviços de ginecologia, a fim de propor um kit de avaliação de bactérias biomarcadoras e sua distribuição para possível relação ao prognóstico de câncer cervical. Relacionar os dados obtidos com amostras de mulheres que apresentam alteração cervical de graus variados.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar características sócio-demográficas e aspectos clínicos de pacientes atendidas no serviço de ginecologia público e privado de Juiz de Fora;
- Detectar o genoma do vírus HPV nas amostras de raspado cervical colhidas das pacientes pela técnica de PCR em tempo real e determinar o genótipo viral associado;

- Avaliar a ocorrência de bactérias biomarcadoras: *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Sneathia sanguinegens*, *Atopobium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella* nas amostras de fluido vaginal dessas pacientes, pela técnica de PCR em tempo real;
- Relacionar a distribuição de bactérias biomarcadoras a características fisiológicas e clínicas das pacientes com infecção pelo HPV e ao estadiamento das possíveis atipias celulares cervicais nessas mulheres.
- Validação do Kit preditivo de câncer do colo do útero.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 População amostrada

Este é um estudo transversal e prospectivo, onde a população estudada é do sexo feminino (n = 66), com idades variando entre 18 e 50 anos, atendidas em seus exames de rotina nos consultórios ginecológicos do sistema único de saúde (SUS) e da rede particular do município de Juiz de Fora (MG). Foram realizadas coletas de fluido vaginal e raspado cervical durante a consulta, durante o período de março de 2016 a dezembro de 2019. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob CAAE número 44545715.5.0000.5147 (Anexo I).

Foram considerados como critérios de inclusão das pacientes no estudo: terem realizado o exame citológico preventivo de Papanicolaou, com resultado normal, sem alteração, conforme classificação do SUS e da Subsecretaria de Atenção Primária à Saúde, não mantiveram relação sexual nos cinco dias que antecedem ao exame, não utilizaram produtos tópicos vaginais, tais como

sabonetes íntimos ou cremes vaginais e, finalmente, aquelas que aceitarem participar do estudo, mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo II e III). Foram considerados critérios de exclusão: pacientes grávidas, pacientes que mantiveram relação sexual nos cinco dias que antecedem ao exame, que utilizaram produtos tópicos vaginais, tais como sabonetes íntimos ou cremes vaginais, além daquelas que não consentirem em participar do estudo. As pacientes participantes responderam a um questionário para caracterização do perfil epidemiológico, além do preenchimento das fichas de acompanhamento clínico do SUS, feita pelos profissionais de saúde (Anexos IV e V).

Considerando-se os riscos envolvendo pesquisa com seres humanos, de acordo com o preconizado pela legislação vigente, o estudo em questão foi classificado como de risco mínimo para as participantes. As amostras foram coletadas durante consulta ginecológica pelo médico ou enfermeiro responsável, concomitantemente aos procedimentos realizados rotineiramente neste serviço, o que contribuiu para diminuir os eventuais desconfortos gerados.

#### **4.2 Coleta dos espécimes clínicos**

Um raspado da mucosa cervical das pacientes encaminhadas ao serviço de citologia da Prefeitura Municipal de Juiz de Fora foi obtido, utilizando-se uma escovinha, para pesquisa de HPV. Além disso, uma amostra de fluido vaginal foi coletada, utilizando um swab estéril, para pesquisa da diversidade bacteriana destas pacientes. Após coleta, as escovinhas e os swabs foram acondicionados separadamente em tubo de 2 mL contendo tampão fosfato salina (PBS) e encaminhados para o Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Microbiana do CEMIC/ICB/UFJF, no mesmo dia, para procedimentos de cultura e biologia molecular. As amostras foram encaminhadas em caixas de isopor com gelo e mantidas em refrigeração até a análise.

### 4.3 Extração de DNA das amostras de fluido vaginal e raspado cervical

O DNA total bacteriano foi extraído das amostras de fluido vaginal coletados a partir do swab utilizando o QIAamp® DNA Blood Minikit (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo o protocolo de bactérias Gram positivas, conforme as orientações do fabricante. O DNA viral foi extraído a partir das amostras coletadas com a escovinha, utilizando o kit mencionado anteriormente, porém seguindo o protocolo para extração de DNA viral, conforme as orientações do fabricante. A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, e a concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop™ (Thermo Scientific).

### 4.4 Determinação dos genótipos virais do HPV

#### 4.4.1 Amplificação da região E6/E7 do genoma viral

Inicialmente, a fim de detectar a presença e os genótipos virais de HPV 16 e 18, foi realizado PCR para as regiões E6 e E7. As sequências dos iniciadores foram: E6CF4 – forward (5' ATT CTG TGT ATG GAG AAA CAT TAG AA 3') e E7CR3 reverse (5' TGA GCT GTC GCT TAA TTG CTC 3') (YAMAGUCHI *et al.*, 2002b).

A reação teve como volume final 25 µL, utilizando 12,5 µL de Gotaq Green Master Mix, com concentração de 2X (PROMEGA, WI/USA), 3,5 µL de água, 1 µL de cada oligoiniciador (10 pMol/µL) e 7 µL de DNA molde. A reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos para anelamento, 72°C por 30 segundos para a extensão. O ciclo de amplificação foi seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos (YAMAGUCHI *et al.*, 2002b).

#### 4.4.2 Genotipagem do HPV

Utilizando a técnica de *Hemi-Nested-PCR* foi possível realizar a genotipagem inicial, através de reações independentes para cada tipo viral, HPV 16 e 18. A técnica permite o aprimoramento da especificidade e eficiência da reação, utilizando o produto da amplificação da região E6/E7 para realizar a segunda reação, sendo um iniciador (E7CR3) o mesmo utilizado na reação anterior e o outro iniciador, dependendo do tipo viral, interno à região consenso amplificada. Os iniciadores utilizados no *Hemi-Nested-PCR* estão descritos na tabela 1 (YAMAGUCHI *et al.*, 2002b).

Em todas as reações para os diferentes tipos foi utilizado o branco, sem DNA molde. As reações de PCR foram realizadas no termociclador T1 Termocycler (Biometra - Deutschland). Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados em gel de agarose 2% em TBE 0,5 X, após eletroforese em voltagem constante de 80V, por 1 hora e 15 minutos para a visualização das bandas.

Como controle positivo, foi utilizado DNA viral de HPV 16 e 18, cedido gentilmente pelo Laboratório Hermes Pardini, em Belo Horizonte/MG.

Tabela 1: Iniciadores, sequência, tipo viral, tamanho e gene-alvo usados no *Hemi- Nested-PCR*.

Iniciador	Sequência	Tipo viral	Tamanho do amplicon	Gene alvo
16SF1	5' TGA GCT GTC GCT TAA TTG CTC 3'	HPV 16	149	e6/e7
18SF2	5' CCA TTC GTG CTG CAA CCG 3'	HPV 18	177	e6/e7

Fonte: (YAMAGUCHI *et al.*, 2002b).

#### 4.4.3 Genotipagem do HPV por qPCR Multiplex com sondas *TaqMan*

O DNA de todas as amostras foi submetido à amplificação por PCR em tempo real (qPCR), em uma reação Multiplex, utilizando as sondas *TaqMan*. Foram testados os genótipos de HPV 16 e 18. Para verificar a qualidade do DNA, foi utilizado a  $\beta$ -globina nas reações. As análises foram realizadas no termociclador StepOne™ (Thermo Scientific). As amostras foram analisadas em duplicata e padronizadas na concentração de 10 ng/ $\mu$ L.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação foram o HPV 16, HPV 18 e  $\beta$ G (10 pMol/ $\mu$ L), e as sondas (5 pMol/ $\mu$ L) estão descritos nas tabelas 2 e 3 (adaptado de SCHMITZ *et al.*, 2009). As reações foram feitas com volume final de 20  $\mu$ L, composta por 1  $\mu$ L de cada iniciador (10 pMol/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de cada sonda (5 pMol/ $\mu$ L), 6  $\mu$ L de água, 10  $\mu$ L de PrimeTime™ Gene Expression Master Mix (IDT DNA) e 1  $\mu$ L de DNA (10 ng/ $\mu$ L).

A qPCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 50°C por 2 minutos, seguida de 94°C por 10 minutos, 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 20 segundos e extensão a 60°C por 40s. A curva padrão para os genótipos estudados foi construída a partir de diluições seriadas ( $10^{10}$  –  $10^1$  cópias/ $\mu$ L) do DNA genômico de HPV 16, 18 e células SiHa (SCHMITZ *et al.*, 2009). Os controles positivos foram cedidos pelo Laboratório Hermes Pardini, como já mencionado.

Tabela 2: Iniciadores utilizados no qPCR.

Iniciadores	Sequência Iniciadores (5'- 3')	Tamanho do fragmento	Gene alvo
HPV 16 for HPV 16 rev	GAA CCG AAA CCG GTT AGT ATA A ATG TAT AGT TGT TTG CAG CTC TGT	128	HPV 16
HPV 18 for HPV 18 rev	GGA CCG AAA ACG GTG TAT ATA A CAG TGA AGT GTT CAG TTC GGT	124	HPV 18
bG for bG rev	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	110	$\beta$ Globina humana

for: Forward; rev: Reverse

Tabela 3: Sondas utilizadas no qPCR.

Sonda	Sequência (5'-3')
1 – HPV 18	TAMRA – ATG TGA GAA ACA CAC CAC AAT ACT ATG GCG CG – 3 BHQ-2
2 - HPV 16	FAM – CAT TTT ATG CAC CAA AAG AGA ACT GCA ATG TTT C – 3 BHQ-1
3 – Bg	YAK YEL – TCA AAC AGA ZEN CAC CAT GGT GCA TCT GAC TCC – 3IABkFQ

BHQ – black hole quencher

#### 4.5 Avaliação da ocorrência de biomarcadores da microbiota vaginal

A ocorrência de bactérias biomarcadoras da microbiota vaginal foi realizada por quantificação relativa, através da análise do  $\Delta\Delta C_T$ , utilizando o método de Pfaffl (2001), de acordo com a literatura, através da fórmula abaixo -figura 3- (STEVENSON; WEIMER, 2007). Esse método verifica a amplificação do gene em questão (alvo) em relação à amplificação de um gene de referência, no caso, o rDNA16S, que representa o total de bactérias de determinada amostra. Então a normalização do gene específico (alvo) é realizada pelo gene de referência a fim de compensar variações inter PCR. A finalidade do método de quantificação relativa empregado é determinar a concentração do gene específico em relação ao total de bactérias presentes na amostra. (MAGALHÃES *et al.*, 2019; NAVIDSHAD; LIANG; JAHROMI, 2012).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta C_{\text{reference}}(\text{control-sample})}}$$

Figura 3: Equação utilizada no método de Pfaffl.

Os ensaios foram realizados no termociclador StepOne™ (Thermo Scientific). As amostras foram analisadas em duplicata e padronizadas na concentração de 10 ng/μL. As reações foram feitas com volume final de 25 μL, composta por 1 μL de cada iniciador (10 pMol/μL), 9,5 μL de água e 12,5 μL *itaq Universal Sybr Green Supermix* (Bio-Rad).

A reação de PCR para os biomarcadores foi realizada sob a seguinte condição: temperatura inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos seguida de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto para a desnaturação, 60°C a 64°C, de acordo com a Tab 4, por 1 minuto para o anelamento e 72°C para extensão, e a extensão final de 72°C por 10 minutos.

Tabela 4: Iniciadores utilizados no qPCR das bactérias biomarcadoras.

Iniciadores	Sequência Iniciadores (5'- 3')	Tam. Frag.	Temp. Anelamento
<i>Gardnerella vaginalis</i> F <i>Gardnerella vaginalis</i> R	GGAAACGGGTGGTAATGCTGG CGAAGCCTAGGTGGGCCATT	125	60°C
<i>Atopobium vaginae</i> F <i>Atopobium vaginae</i> R	GTTAGGTCAGGAGTTAAATCTG TCATGGCCCAGAAGACC	157	62°C
<i>Peptostreptococcus</i> sp. F <i>Peptostreptococcus</i> sp. R	TCATAGGAGGAAGCCCTGGCTAAA TAAGCTCCACGCTTTGACACCTGA	134	64°C
<i>Prevotella</i> spp. F <i>Prevotella</i> spp. R	GGGATGCGTCTGATTAGCTTGTT CTGCACGCTACTTGGCTGGTTC	179	62°C
<i>Sneathia sanguinegens</i> F <i>Sneathia sanguinegens</i> R	GATGGGAGCTAGCTTGCTAGAAGAAG GCTCTCATATAGCGTATTGCTACC	160	64°C
<i>Lactobacillus gasseri</i> F <i>Lactobacillus gasseri</i> R	CGAGCTTGCCTAGATGAATTTG CTCTAGACATGCGTCTAGTG	162	62°C
<i>Lactobacillus iners</i> F <i>Lactobacillus iners</i> R	TTGAAGATCGGAGTGCTTGC TTATCCCGATCTCTTGGGCA	128	64°C
<i>Lactobacillus crispatus</i> F <i>Lactobacillus crispatus</i> R	GATTTACTTCGGTAATGACGTTAGGA AGCTGATCATGCGATCTGCTTTC	125	63°C
<i>Lactobacillus jensenii</i> F <i>Lactobacillus jensenii</i> R	GCCTATAGAAATTCTTCGGAATGGACA CAAATGGTATCCCAGACTTAAGGG	169	62°C

F: Forward; R: Reverse Fonte:(ZOZAYA-HINCHLIFFE *et al.*, 2010).

Como controle positivo, foram utilizados ATCCs de *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium vaginae* presentes no repositório do Laboratório (CEMIC – UFJF), as outras bactérias foram realizadas reações de PCR para 2 amostras usando os iniciadores específicos para as bactérias estudadas. O produto de PCR foi purificado usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc.). O fragmento de DNA obtido foi sequenciado pelo método Sanger na Plataforma de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ/MG. O resultado foi comparado com o banco de dados de nucleotídeos (NT) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para confirmar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores dos biomarcadores da microbiota vaginal.

#### **4.6 Análises estatística**

O resultado do PCR em tempo real foi analisado pelo método de *Pfallf*. Desses dados foi construído o Mapa de calor utilizando o Excel. Posteriormente, foram realizados a média e Teste de ANOVA para os gráficos de abundância relativa, utilizando o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA).

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Características sócio-demográficas e aspectos clínicos de pacientes atendidas no serviço de ginecologia da Prefeitura Municipal de Juiz de Fora**

Foram obtidas 66 amostras cervicais de mulheres clinicamente saudáveis. A média de idade foi de 35 anos, sendo a idade mínima de 18 anos e a máxima de 49 anos. A tabela 5 mostra as variáveis sócio-demográficas, onde, de maneira geral, pode-se observar que 45% das mulheres eram

brancas, 48% possuíam ensino médio completo e 47% classificaram seu estado civil como solteiras.

As características clínicas e comportamentais, relatadas pelas pacientes durante a consulta ginecológica, estão apresentadas na tabela 6. De maneira geral, a maioria das mulheres apresentou vida sexual ativa, assim como o número de parceiros acima de 01. Em relação a presença de fluido vaginal, a maioria das mulheres relatou a presença dele, com aspecto fluido e coloração branca. Em suma, no momento da coleta as mulheres não apresentaram nenhuma queixa ginecológica significativa.

Tabela 5: Características sócio-demográficas das mulheres participantes do estudo

<b>Variáveis analisadas</b>	<b>(n = 66)</b>
<b>Idade</b>	
18 – 25	21 (32%)
26 – 35	28 (42%)
36 - 45	10 (15%)
> 46	7 (11%)
<b>Estado civil</b>	
Solteira	31 (47%)
Casada	27 (41%)
Outros	8 (12%)
<b>Etnia</b>	
Branca	30 (45%)
Parda	17 (26%)
Negra	19 (29%)
<b>Escolaridade</b>	
Ensino fundamental incompleto	8 (12%)
Ensino fundamental	7 (11%)

Ensino médio incompleto	5 (8%)
Ensino médio	32 (48%)
Ensino superior incompleto	2 (3%)
Ensino superior	12 (18%)

Tabela 6. Características clínicas e comportamentais das mulheres participantes do estudo.

Variáveis analisadas	Frequência de observação	
	n	%
Vida sexual ativa		
Sim	60	90,9
Não	6	9,1
Número de parceiros sexuais		
1 parceiro	3	4,5
≥ 2 parceiros	63	95,5
Fluxo cervical		
Sim	60	90,9
Não	6	9,1
Aspecto do muco cervical		
Fluido	48	72,8
Grumoso	3	5
Ignorado	15	22,2
Coloração do muco cervical		
Branco	48	72,8
Amarelado	7	10,6
Ignorado	11	16,6

## 5.2 Avaliação da presença e genótipos prevalentes do vírus HPV nas amostras de raspados cervicais

Das 66 amostras, em 80% foi detectado o DNA do HPV. A tabela 9 mostra a frequência de amostras HPV positivas em relação a idade. Dentre essas, observou-se a prevalência de infecção múltipla (co-infecção) por HPV 16 e 18 em 27% das mulheres. Monoinfecção por HPV 16 foi encontrado em 11% das mulheres, e por HPV 18 em 62%.

A tabela 7 demonstra a frequência de observação das mulheres com monoinfecção. A análise dos genótipos virais em relação as variáveis clínico

comportamentais encontra-se na tabela 8, assim como a distribuição dos genótipos de HPV em relação a faixa etária encontram-se na tabela 9.

Tabela 7: Frequência de observação de monoinfecção por HPV detectados em 39 mulheres participantes do estudo.

Genótipos virais	Frequência de observação	
	n	%
HPV 16	6	11
HPV 18	33	62

Tabela 8: Análise dos genótipos virais em relação as variáveis clínico comportamentais.

Variáveis analisadas	Genótipos virais			
	HPV 16	HPV 18	HPV 16 e 18	HPV Negativo
Vida sexual ativa	6 (86%)	32 (97%)	12 (86%)	11 (85%)
Vida sexual inativa	1 (14%)	1 (3%)	2 (14%)	2 (15%)
>1 parceiro sexual	7 (100%)	31 (94%)	13 (91%)	12 (100%)
Presença de fluido cervical	7 (100%)	33 (100%)	14 (100%)	13 (100%)
Muco Fluido	3 (43%)	24 (73%)	11 (79%)	11 (85%)
Muco grumoso	1 (14%)	2 (6%)	0	0
Muco Ignorado	3 (43%)	7 (21%)	3 (21%)	2 (15%)
Coloração branco	4 (57%)	28 (85%)	7 (50%)	10 (77%)

Coloração amarelado	2 (29%)	2 (6%)	1 (7%)	2 (15%)
Coloração ignorado	1 (14%)	3 (9%)	6 (43%)	1 (8%)

Tabela 9: Distribuição dos tipos de HPV de acordo com a faixa etária.

Tipo de infecção	Genótipos virais	Faixa etária (anos), frequência de observação (n;%)			
		18-25 (n=17)	26-35 (n=17)	36-45 (n=15)	≥ 46 (n=4)
Monoinfecção	HPV 16	4(23,5)	1 (6)	1 (7)	0 (0)
	HPV 18	9 (53)	13 (76)	7 (46,5)	4 (100)
Coinfecção	HPV 16 / HPV 18	4 (23,5)	3 (18)	7 (46,5)	0 (0)

O diagnóstico de HPV foi realizado através de PCR em tempo real, com quantificação absoluta, na qual a carga viral pode ser analisada na figura 04.

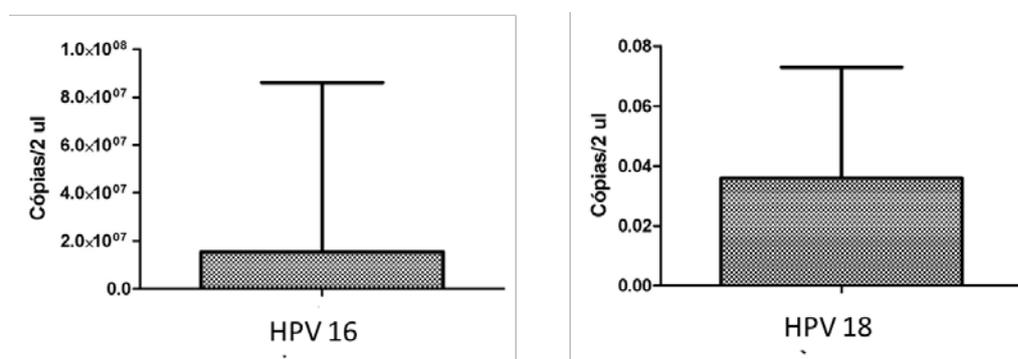


Figura 04: Carga viral média (Cópias /2uL) de HPV 16 e 18.

### 5.3 Screening de bacterias biomarcadoras

Foram avaliadas a presença e quantificação relativa das seguintes bactérias: *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Sneathia sanguinegens*, *Atopobium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*.

A microbiota vaginal das mulheres participantes do estudo, é predominantemente dominada por *Lactobacillus* spp., sendo a espécie mais frequentemente encontrada *L. crispatus*, referente a CST I (77%), seguida de 2% na CST II, com predomínio de *L. gasseri* e 21% das amostras está distribuída na CST IV, com redução de *Lactobacillus* spp e predominância das bactérias biomarcadoras.

Na tabela 10 pode ser observada a distribuição das comunidades de mulheres Negativas para HPV, na qual verifica-se predominância de *L. crispatus*. A amostra H17 além do *L. crispatus* também apresenta alta porcentagem de *G. vaginalis* e *Atopobium*, seguido de *Prevotella* e *L. iners*, uma vez que se trata de uma mulher com vaginose bacteriana, ou seja, pertencente a CST IV.

Tabela 10: Mapa de Calor das comunidades bacterianas nas amostras negativas para HPV.

n	<i>L. crispatus</i>	<i>L. iners</i>	<i>L.gasseri</i>	<i>L. jensenii</i>	<i>Peptos</i>	<i>Prevotella</i>	<i>G. vaginalis</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Sneathia sanguinegens</i>
39	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Light Green	Yellow	Green
47	Red	Yellow	Green	Orange	Green	Yellow	Light Green	Yellow	Yellow
66	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Orange	Green	Green	Green
79	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Light Green	Yellow	Green	Yellow
117	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Green	Yellow	Yellow	Green
119	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Green	Green
125	Red	Green	Yellow	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green
138	Red	Yellow	Green	Yellow	Light Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green
H1	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow
H7	Red	Orange	Green	Orange	Green	Yellow	Yellow	Green	Green
H8	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Yellow	Green	Yellow
H14	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Green	Green
H17	Orange	Yellow	Green	Green	Green	Orange	Red	Orange	Green

Legenda: CST's: Pept – *Peptostreptococcus*, Prevot- *Prevotella*. As cores mais quentes (tons de rosa) representam valores maiores; tons de laranja, valores intermediários e tons de verde, os menores valores.

Com relação ao grupo de mulheres com monoinfecção por HPV 16, verifica-se a ocorrência *L. crispatus* com maior porcentagem; entretanto na amostra 33 observa-se maior porcentagem de *L. jenseni*, seguido de *L. iners*, *Prevotella* e *Atopobium*. A amostra 134 apresenta além do *L. crispatus*, alta porcentagem de *G. vaginalis* seguida de *L.gasseri*, *Prevotella* e *Atopobium*; sendo essas duas compostas por mulheres que não apresentam vaginose bacteriana. Ao contrário das amostras 78 e 104, características de mulheres com essa enfermidade, fazendo parte do grupo CST IV (tabela 11).

Tabela 11: Mapa de calor das amostras de monoinfecção por HPV 16.

n	<i>L. crispatus</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. jenseni</i>	<i>Peptos</i>	<i>Prevotella</i>	<i>G. vaginalis</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Sneathia sanguinegens</i>
33	Red	Yellow	Green	Orange	Green	Yellow	Green	Yellow	Green
64	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green
78	Green	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Orange	Red
95	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow	Green	Yellow
104	Green	Green	Yellow	Green	Orange	Yellow	Red	Orange	Green
134	Red	Green	Orange	Green	Green	Yellow	Orange	Yellow	Green

Legenda: CST's: Pept – *Peptostreptococcus*, Prevot- *Prevotella*. As cores mais quentes (tons de rosa) representam valores maiores; tons de laranja, valores intermediários e tons de verde, os menores valores.

No grupo de mulheres com monoinfecção por HPV 18, existe predominância de CST I. As amostras 53, 67, 68, 98 e H16 são da CST IV, conforme mostrado na tabela 12.

Tabela 12: Mapa de calor das amostras de monoinfecção por HPV 18.

n	<i>L. crispatus</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. jenseni</i>	<i>Peptos</i>	<i>Prevotella</i>	<i>G. vaginalis</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Sneathia sanguinegens</i>
36	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Green	Green
40	Red	Green	Yellow	Orange	Green	Yellow	Green	Yellow	Green
41	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green
53	Yellow	Green	Green	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Red	Green
67	Yellow	Yellow	Green	Green	Red	Yellow	Green	Green	Green
68	Yellow	Green	Yellow	Green	Green	Orange	Red	Yellow	Green
70	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Orange	Green	Yellow	Green
71	Orange	Green	Yellow	Green	Green	Yellow	Red	Green	Orange
76	Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Green	Green
80	Red	Green	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow	Green



Legenda: CST's: Pept – *Peptostreptococcus*, Prevot- *Prevotella*. As cores mais quentes (tons de rosa) representam valores maiores; tons de laranja, valores intermediários e tons de verde, os menores valores.

Na figura 05, verifica-se a abundância relativa dos microrganismos encontrados distribuídos nos grupos em questão.

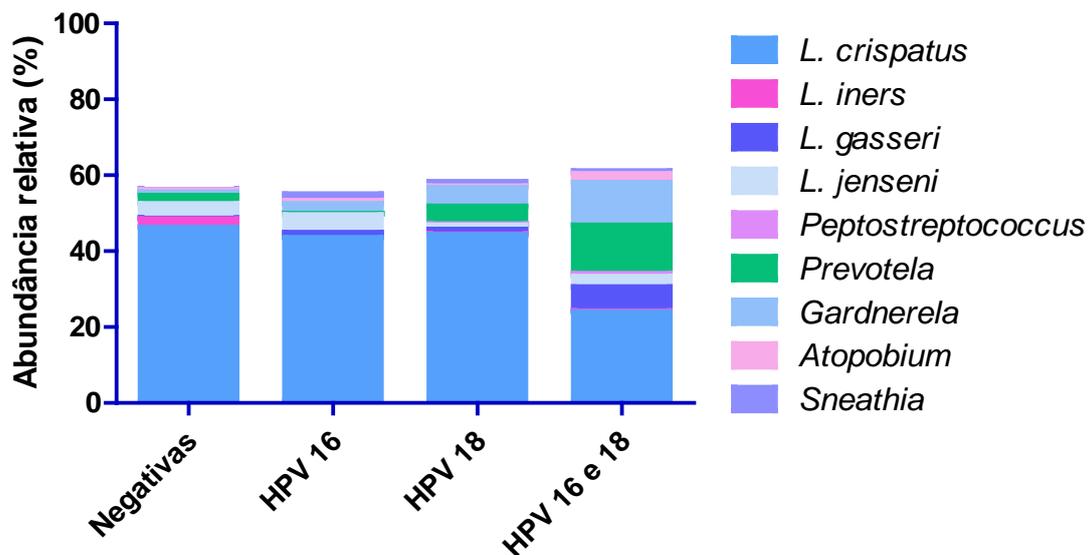


Figura 05: Abundância relativas das bactérias biomarcadoras

#### 5.4 Proposição análise prognóstica de câncer do dolo do útero

A fim de validar o kit prognóstico de câncer do colo do útero, foi realizada a metodologia proposta com amostras de mulheres que apresentaram atipias celulares cervicais de graus variados ( $n = 41$ ), como ASCUS – atipias com significado indeterminado (*Atypical squamous cells of undetermined significance*), Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (*Low grade squamous intraepithelial lesions – LSIL*) que anteriormente era classificada como NIC I; e Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (*High grade squamous intraepithelial lesions – HSIL*) compreendendo NIC II e NIC III; e aquelas em que não é possível excluir lesão de alto grau (*Atypical squamous*

*cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion - ASC-H)* (VALIYA; BAXI, 2015; VERMA, 2014). Estas amostras foram distribuídas de acordo com o tipo de atipia observado, sendo a maior frequência de participantes com atipias celulares do tipo Células Escamosas Atípicas com Significado Indeterminado (ASC-US) 31,71%, seguidas de Lesão Intraepitelial Escamosa de baixo Grau (LSIL) e Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL), ambas com 26,83%. Células Escamosas Atípicas que não excluem Lesões Intraepiteliais de Alto Grau (ASC-H) foi observado em 14,63% das participantes.

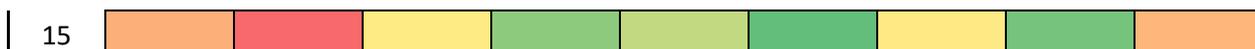
Com relação as mulheres com lesões cervicais foi detectado o vírus HPV em 97,56%. Foram identificados 5 tipos de HPV pertencentes ao grupo de alto risco, HPV 16, 18, 31, 52 e 58. Uma amostra de raspado cervical não teve seu tipo viral detectado, embora seja positiva. De maneira geral, considerando-se todos os tipos de HPV detectados neste estudo, o genótipo viral encontrado com maior prevalência foi o HPV 16 (85,13%), seguido do HPV 18 (68,92%). Três amostras apresentaram HPV 52, três apresentaram HPV 58 e uma amostra apresentou HPV 31. A frequência desse grupo foi de 87,80% para HPV 16, HPV 18 (68,29%), HPV 31 (2,44%), HPV 52 e 58 (4,88%).

As amostras foram distribuídas de acordo com o tipo de lesão. Na tabela 14 estão agrupadas as amostras de lesão ASC US, tabela 15 ASCH, na 16 LSIL e 17 HSIL.

Tabela 14: Mapa de calor das amostras de lesão de ASC US.

n	LJ	LC	LG	A	Prev	S	GV	Pepto	LI
87	Green	Green	Green	Red	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Yellow
72	Yellow	Green	Yellow	Green	Green	Yellow	Red	Yellow	Orange
69	Orange	Green	Yellow	Green	Green	Green	Red	Orange	Yellow
61	Yellow	Green	Red	Green	Green	Yellow	Yellow	Light Green	Orange
60	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow	Green	Yellow
57	Green	Green	Red	Yellow	Orange	Green	Orange	Green	Orange
55	Yellow	Red	Yellow	Light Green	Yellow	Green	Yellow	Green	Yellow
54	Green	Red	Light Green	Yellow	Red	Green	Yellow	Green	Red
30	Red	Orange	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Red
27	Green	Green	Green	Orange	Yellow	Orange	Red	Light Green	Yellow





Legenda: CST's: LJ – *L. jenseni*, LC – *L. crispatus*, A – *Atopobium*, S – *Sneathia*, LI – *L. iners*, GV – *Gardnerella vaginalis*, Pept – *Peptostreptococcus*, Prevot- *Prevotella*. As cores mais quentes (tons de rosa) representam valores maiores; tons de laranja, valores intermediários e tons de verde, os menores valores. A amostra 48, 25, 24 e 41 representam a CST IV.

Tabela 17: Mapa de calor das amostras de HSIL.

n	LJ	LC	LG	A	Prev	S	GV	Pepto	LI
85	yellow	green	green	yellow	yellow	green	red	red	green
83	green	red	light green	yellow	light green	green	yellow	yellow	orange
62	red	green	yellow	green	yellow	green	yellow	yellow	green
46	green	orange	green	red	yellow	green	yellow	light green	yellow
32	yellow	red	yellow	green	green	green	yellow	green	orange
29	yellow	red	orange	green	green	green	yellow	green	yellow
28	yellow	green	yellow	green	green	orange	red	green	orange
19	light green	green	green	orange	orange	green	red	yellow	yellow
14	green	green	green	red	red	red	yellow	orange	green
10	green	red	yellow	yellow	yellow	green	orange	green	red
9	green	red	yellow	light green	yellow	green	yellow	green	yellow

Legenda: CST's: LJ – *L. jenseni*, LC – *L. crispatus*, A – *Atopobium*, S – *Sneathia*, LI – *L. iners*, GV – *Gardnerella vaginalis*, Pept – *Peptostreptococcus*, Prevot- *Prevotella*. As cores mais quentes (tons de rosa) representam valores maiores; tons de laranja, valores intermediários e tons de verde, os menores valores. A amostra 85, 46, 28, 19 e 14 representam a CST IV, enquanto que 62 e 10 são amostras que apresentam escore de Nugent Intermediário.

Na figura 6, verifica-se a abundância relativa dos microrganismos encontrados distribuídos nos grupos em questão.

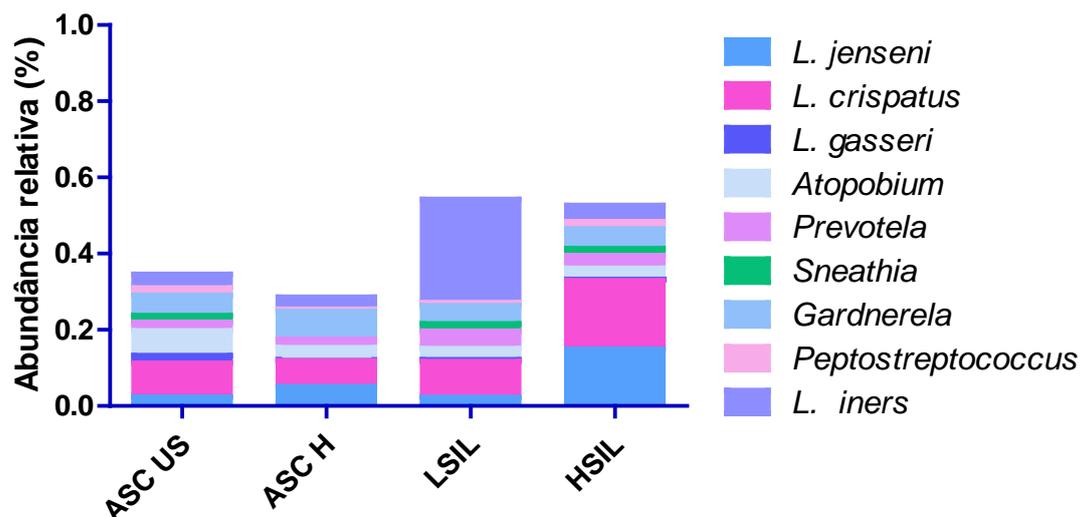


Figura 06: Abundância relativa das bactérias biomarcadoras nas amostras de mulheres com lesão.

Os valores de referência para os microrganismos encontram-se na tabela 18 (ANEXO VI).

Para a interpretação do Kit de prognóstico (tabela 19) foi realizada a média das amostras de mulheres HPV negativas em relação a mulheres com HSIL e pertencentes a CST IV, com valores intermediários de mulheres com lesões do tipo ASC US e ASC H.

Tabela 18: Valores de referência do resultado do kit.

	<i>L. crispatus</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. jenseni</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Gardnerella</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Sneathia</i>
Mulheres com distribuição microbiana compatíveis com microbiota vaginal em pacientes sem risco de desenvolvimento de CC	0,02368 a 0,81225	0,00007 a 0,21909	0 a 0,00091	0 a 0,25	0,00	0,0003 a 0,0161	0 a 0,03560218	0 a 0,0283124	0 a 0,0103

Tabela 19: Interpretação do Kit de prognóstico .

Grupos	Biomarcadores		Proposta de apresentação de resultados	Provável interpretação prognóstica
	Maiores níveis	Menores níveis		
<b>Mulheres HPV Negativas</b>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. iners</i> <i>S. sanguinegens</i> <i>Peptostreptococcus</i>	<i>L. crispatus</i> +++++ <i>Atopobium</i> + <i>G. vaginalis</i> ++	Mulheres com distribuição microbiana compatíveis com microbiota vaginal em pacientes sem risco de desenvolvimento de CC
<b>Mulheres Monoinfecção HPV 16</b>	<i>L. crispatus</i> <i>G. vaginalis</i> <i>L. jenseni</i> <i>L. gasseri</i>	<i>Atopobium</i> <i>Prevotella</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>L. iners</i>	<i>L. crispatus</i> +++++ <i>G. vaginalis</i> +++ <i>L. . gasseri</i> + <i>L. jenseni</i> +++++ <i>S. sanguinegens</i> +	Mulheres com distribuição microbiana compatíveis com microbiota vaginal em pacientes com risco de desenvolvimento de CC
<b>Mulheres Monoinfecção HPV 18</b>	<i>G. vaginalis</i> <i>Prevotella</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>S. sanguinegens</i> <i>Atopobium</i> <i>Lactobacillus</i>	<i>L. crispatus</i> <i>L. iners</i>	<i>Peptostreptococcus</i> +++++ <i>G. vaginalis</i> +++++ <i>Atopobium</i> ++ <i>L. crispatus</i> +++++ <i>Prevotella</i> +++ <i>S. sanguinegens</i> +++	Mulheres com distribuição microbiana compatíveis com microbiota vaginal em pacientes com risco de desenvolvimento de CC

<b>Mulheres Coinfecção HPV 16 e 18</b>	<i>L. crispatus</i> <i>L. jenseni</i> <i>L. gasseri</i> <i>Prevotella</i> <i>Atopobium</i> <i>S. sanguinegens</i> <i>G. vaginalis</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. crispatus</i> +++++ <i>G. vaginalis</i> +++++ <i>Atopobium</i> +++++ <i>Prevotella</i> +++++ <i>S. sanguinegens</i> ++	Mulheres com distribuição microbiana compatíveis com microbiota vaginal em pacientes com risco de desenvolvimento de CC
--	---	-----------------	--	---

Valores de cruces baseados na média dos valores de referência.

## 6 DISCUSSÃO

A microbiota vaginal é dominada por microrganismos que contribuem para o equilíbrio desse microambiente, promovendo a saúde do ecossistema. Uma mulher saudável apresenta predominância do gênero *Lactobacillus* acompanhado de menor abundância de bactérias como *Prevotella*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, dentre outras, e fungos do gênero *Candida* (DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2016). Muitas vezes a constituição da microbiota pode sofrer modificações, diante de fatores internos e externos, como alimentação, *stress*, uso de anticoncepcional, hormônios, entre outros, podendo gerar doenças, em especial a vaginose bacteriana (OJALA *et al.*, 2014).

A vaginose bacteriana (VB) é uma síndrome polimicrobiana decorrente da depleção de *Lactobacillus* e aumento de bactérias anaeróbias, como a *G. vaginalis* e *Sneathia*; o que caracteriza a CST IV. Estudos vem demonstrando que mulheres que apresentam a CST IV, assim como infecção pelo Papilomavírus humano (HPV), essa associação pode atuar como um cofator para a persistência da infecção, que leva ao desenvolvimento de alterações celulares e câncer (BARRETO ALVES *et al.*, 2016).

O câncer do colo do útero é um problema de saúde pública. Em 2020, aproximadamente 604000 mulheres tiveram o diagnóstico dessa doença no mundo todo; dessas mulheres, 342000 morreram. No Brasil, esse tipo de câncer foi responsável por 6627 mortes no ano de 2020. Estima-se, segundo o Ministério da Saúde, a ocorrência de 17 mil novos casos nos próximos anos (2023 a 2025) (INCA, 2022).

Considerando o cenário mundial e nacional, e ainda a importância da microbiota vaginal na saúde da mulher, estudar e compreender a dinâmica desse microambiente é essencial para a promoção da qualidade de vida e bem estar feminino. Nesse contexto, existe a necessidade de diagnósticos e exames complementares que visam a promoção da saúde e um acompanhamento médico mais individual e personalizado, uma vez que as mulheres apresentam em sua comunidade microbiana particularidades,

complexidades individuais, necessitando assim de um estudo mais detalhado dos microrganismos que participam dessa dinâmica.

A caracterização sócio demográfica e clínico comportamental das mulheres participantes do estudo permite que seja traçado a vulnerabilidade do grupo. Vulnerabilidade envolve os fatores de risco que levam a susceptibilidade das pessoas as doenças, em especial as doenças infecciosas, como é o caso do HPV. Compreender esses fatores é fundamental para a promoção de saúde, uma vez que permitem a correção dos pontos fracos de determinado programa, assim como, permitem a implementação de políticas de saúde e monitoramento, procurando otimizar o tratamento de doenças através de um diagnóstico precoce, o que no caso de câncer de colo do útero é de extrema relevância (SEVALHO; SEVALHO, 2017).

A partir de dados relatados pelas participantes do estudo, foi possível traçar um perfil das mulheres. As participantes tinham idade entre 18 e 49 anos, sendo a média da idade de 35 anos, são brancas, com ensino médio completo e solteiras, com vida sexual ativa e com mais de um parceiro ao longo da vida, sem queixas ginecológicas, ou seja, mulheres clinicamente saudáveis.

Estudos anteriores indicam que a infecção por HPV está relacionado inversamente à idade, ou seja, quanto menor a idade maior a prevalência por HPV (COLPANI *et al.*, 2020), sendo o pico de prevalência aproximadamente aos 25 anos (ARBYN *et al.*, 2006; CAIXETA *et al.* 2015). De acordo com estudos realizados na América Latina (ALMONTE *et al.*, 2007; FERRECCIO *et al.*, 2004; SKROUPI *et al.*, 2007) ocorre também uma alta na prevalência de HPV em mulheres a partir de 54 anos, sendo esse segundo pico atribuído a mudanças hormonais que precedem a menopausa, alterações no comportamento sexual ou a reativação do HPV que estava latente (Brotherton *et al.*, 2019). Essa distribuição da curva em U também pode ser observada no trabalho de TANG e colaboradores (2021) na China, no qual a taxa de infecção por HPV foi superior em mulheres com menos de 30 anos (22%), seguida de um segundo pico em mulheres mais velhas, maior ou igual a 60 anos (15%). Os dados obtidos no presente estudo corroboram com o Instituto Nacional do

Câncer (INCA, 2022) que verificou a ocorrência de lesões cervicais em mulheres com idade entre 25 a 64 anos, advindas de infecção por HPV.

Mulheres de países menos desenvolvidos estão mais propensas a infecção e câncer, devido a problemas na saúde pública, como a falta de médicos, insuficiência do serviço de saúde e a falta de informação (COLPANI *et al.*, 2020). A prevalência na população desses países varia entre 15 a 45% das mulheres infectadas, e apresenta maior frequência naquelas com idade inferior a 25 anos, logo após o início da atividade sexual, assim como a ocorrência de múltiplos parceiros sexuais (Brotherton *et al.*, 2019). Na África Subsaariana, a prevalência de HPV nessa faixa etária foi de 24%, na Europa oriental foi de 21% e na América Latina foi de 16% (CHAN *et al.*, 2019).

Na Malásia, a prevalência da infecção por HPV está na faixa etária de 15 a 44 anos, sendo o segundo tipo de câncer mais comum na população feminina do país. O estudo aponta que os fatores de risco relacionados são a prática de atividade sexual sem proteção, uso de contraceptivos orais e tabagismo (RAHMAT *et al.*, 2021).

Zhang e colaboradores (2020) ao realizar uma revisão acerca da epidemiologia e os fatores de risco associados a câncer cervical e HPV, conseguiram identificar os principais fatores de risco: relações sexuais sem proteção, principalmente em mulheres jovens (< 16 anos), que iniciaram a vida sexual precocemente; mulheres que tem múltiplos parceiros sexuais possuem maior chance de ter CC; assim como o uso de pílulas anticoncepcionais orais, que usados por 5 anos ou mais podem dobrar o risco de CC; tabagismo; alta paridade; baixa escolaridade e consequentemente baixo nível sócio econômico. Essas características estão relacionadas a países subdesenvolvidos e corroboram com o presente estudo. Os países subdesenvolvidos não apresentam uma política de saúde pública voltada para o rastreio de infecção por HPV e a população menos favorecida, com maiores desigualdades sociais e econômicas são as que apresentam maior prevalência da infecção, devido à falta de informação e atendimento médico mais restrito (KOPS *et al.*, 2021).

O estudo de Wang e colaboradores (2022) no norte da China encontrou prevalência de infecção por HPV em apenas 19,7% das amostras, dessas positivas, a taxa de monoinfecção foi de 13,7%, sendo a mais frequente, infecções por 2 tipos virais foi encontrada em 4,3% e infecções múltiplas, a taxa foi de 1,8%. As maiores taxas de monoinfecção e infecção múltiplas foi encontrada na faixa etária de mulheres com menos de 20 anos. O genótipo de maior prevalência foi o HPV 16 (4,3%), sendo que o HPV 18, com 1,1%, ocupou a 7ª posição. Esses dados foram de encontro ao presente estudo, uma vez que em nosso estudo foi observado uma alta taxa de positividade (80%), com consequentemente alta taxa de infecção de monoinfecção por HPV 16 (11%) e HPV 18 (62%), assim como coinfeção por HPV 16 e 18 (27%).

MARTINS e colaboradores (2016) detectaram os genótipos de HPV em mulheres brasileiras com e sem lesões cervicais, e constataram menor frequência de HPV positivo em relação ao estudo em questão, com resultado de 48,6%. Ao contrário do presente estudo, estes autores encontraram uma baixa frequência com relação ao HPV 18 (5%) e maior frequência do HPV 16 (23,2%).

RESENDE e colaboradores (2014) ao pesquisar mulheres nos estados de São Paulo e Goiás, encontraram alta taxa de HPV (87%), e também de coinfeção (52%) e os tipos virais relatados em coinfeção foram, HPVs 16 e 58, 16 e 52 e 16 e 18, corroborando com o nosso estudo. De acordo com o INCA (2018), 80% das mulheres sexualmente ativas entrarão em contato com o vírus HPV em algum momento da sua vida, ao menos uma vez, o que corresponde a porcentagem encontrada no estudo.

No Brasil, a prevalência de HPV em mulheres com resultado de citologia normal varia de 2,3% a 55,4%, entretanto esses valores são subestimados, uma vez que o rastreio de HPV não é uma prática usual do atendimento médico público no país (COLPANI *et al.*, 2016).

De acordo com WENDLAND e colaboradores (2020) a prevalência de HPV em adolescente e jovens no Brasil é alta (53,6%), na região sudeste a taxa de infecção foi de 49,9%, sendo a maior frequência de positivos nas jovens de 16 a 21 anos. Desses HPVs positivos, a maioria apresentou monoinfecção

(42,2%), múltipla infecção foi detectado em 31%, sendo por 2 tipos virais (26,7%), 3 tipos (12,2%) e 4 tipos ou mais (18,8%). O genótipo de HPV 16 teve frequência de 7,5%, HPV 18 (3,8%) e coinfeção por HPV 16 e 18 (10,73%). Os fatores de risco associados a infecção foram a raça parda, nível sócio econômico e escolaridade baixa, solteiros, fumantes e que apresentaram 2 ou mais parceiros no último ano. Esses dados que estão em conformidade com o presente estudo, que também detectou alta prevalência de HPV na população com citologia normal, assim como os fatores de risco em questão.

A taxa de infecção múltipla mundial é de 18,5 a 46%, em relação a monoinfecção por HPV 16 a prevalência é de 55%, enquanto que HPV 18 é de 14,6%. No presente estudo foi encontrada justamente o contrário a respeito da monoinfecção, que teve maior prevalência de infecção por HPV 18, todavia os dados de coinfeção estão dentro do limite apresentado pelo artigo (ZHOU *et al.*, 2023).

O presente estudo detectou carga viral baixa, uma vez que se trata de mulheres clinicamente saudáveis, com resultado de citologia normal. A carga viral elevada é um fator determinante na persistência da infecção, o que leva ao desenvolvimento de lesões e câncer (LU *et al.*, 2021; OYERVIDES-MUÑOZ *et al.*, 2020). Segundo Van der Weeler (2016), a quantificação da carga viral pode ser uma ferramenta de análise de prognóstico da infecção, atuando como um biomarcador, que prevê a eliminação e a recaída, pois o aumento da carga viral está relacionado ao aumento de persistência.

DEL RÍO-OSPINA e colaboradores (2015) detectaram carga viral mais alta, em relação ao HPV 16, em mulheres que apresentavam NIC, em comparação com mulheres sem lesão, que tiveram uma carga baixa. Entretanto, a relação entre carga viral e gravidade da lesão ainda é controversa, uma vez que fatores relacionados ao hospedeiro, como o sistema imunológico modulam essa associação. WANG e colaboradores (2018) mostraram que a carga viral do HPV 16 pode aumentar gradualmente com o desenvolvimento da lesão e não há correlação entre carga viral do HPV e lesão. A carga viral alta em NIC é devido ao estágio da infecção, aguda, com maior replicação viral. A medida que a lesão progride para NIC 2 e 3, ocorre redução da carga viral, já que a taxa de replicação se torna estável.

A microbiota vaginal de mulheres em idade reprodutiva normalmente é dominada por Lactobacilos. Essas bactérias caracterizam um microambiente saudável, já que impedem a colonização do tecido vaginal por potenciais patógenos e apresentam um efeito protetor, com modulação do sistema imune. Caracterizando, assim as mulheres que apresentam CST I, II, III e V. Algumas mulheres tem predominância de bactérias anaeróbias, ocorrendo um desequilíbrio do microambiente vaginal, o que caracteriza a CST IV. A maioria dessas mulheres não apresentam queixas ginecológicas, parecendo serem saudáveis. O estudo em questão distribuiu as mulheres de acordo com a CST, 77% das mulheres apresentam CST I, 2% compõem a CST II e 21% a CST IV. Dados que corroboram com o trabalho de France e colaboradores (2022), que relatam que 90% das mulheres apresentam as CST's I, III e IV, sendo a mais prevalente a CST I. Che e colaboradores (2020) também relataram que mulheres brancas apresentam microbiota classificada como CST I (80,2%). Acredita-se que *L. jensenii* seja equivalente a *L. crispatus* em sua proteção no ambiente vaginal, devido a semelhanças metabólicas que a espécie possuem, entretanto é mais raro encontrar esse tipo de comunidade, apresentando assim pouca informação sobre a mesma.

Com relação as amostras negativas para HPV (n = 13), a maioria (n = 12) apresentam CST I, sendo apenas uma mostra pertencente a CST IV. Entretanto, nessa amostra foi detectado alta porcentagem de *L. crispatus*, seguido de *L. iners*. Alterações na composição da microbiota vaginal são frequentes, principalmente no início da menstruação, na qual ocorrem alterações hormonais e biofísicas que promovem mudanças na fisiologia do hospedeiro e após a prática de atividade sexual sem camisinha, onde o sêmen presente na vagina é uma substância alcalina que aumenta temporariamente o pH vaginal e ainda existe a possibilidade de introdução de patógenos oriundos do pênis. Ainda existem alterações advindas de mudanças no sistema imune, uso de antimicrobianos, alimentação, entre outros fatores que modulam a dinâmica da microbiota vaginal (CHEE; CHEW; THAN, 2020; DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2016; (CUNHA *et al.*, 2017)).

A microbiota, ao longo da vida, pode afetar a fisiologia do hospedeiro, assim como o contrário também é verdadeiro. Por isso, as transições entre as

comunidades ocorrem facilmente. A CST IV é mais frequente em mulheres negras e hispânicas (40%). Muitas mulheres vivem em constantes transições de CST's, sempre voltando a CST IV (CHEE; CHEW; THAN, 2020; GAJER *et al.*, 2012; RAVEL, JACQUES; FORNEY; *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2014).

De modo geral, as amostras que apresentaram a CST IV, foram distribuídas entre os grupos: 1 amostra não apresenta DNA do HPV, como descrito acima; das amostras de monoinfecção por HPV 16 (n = 6) 2 amostras pertencem a essa comunidade; com relação a monoinfecção por HPV 18 (n = 33) tem 5 amostras, e no grupo de coinfeção tem 6 amostras na CST IV.

A maioria das mulheres apresentam microbiota classificada como CST I. Mulheres brancas tem predominância de lactobacilos (80,2%) corroborando com os dados do estudo (CHEE; CHEW; THAN, 2020).

Destaca-se a amostra 34, de uma mulher HPV positiva, de coinfeção, com histórico de sangramentos recorrentes e mioma. Essa mulher apresentou lesão após 6 meses do diagnóstico de HPV e teve que sofrer histerectomia. Assim como a amostra 11, que apresentou as mesmas características, que também culminaram com a histerectomia. A amostra 35 é de uma mulher HPV positivo, com coinfeção, que apresenta sangramentos frequentes e mioma. A amostra 16 é de uma mulher com os mesmos sintomas da mulher anterior, entretanto apresenta monoinfecção por HPV 18.

A VB tem sido associada a doenças cérvico-vaginais, como doença inflamatória pélvica, endometrite, abortos e miomas, assim como a persistência da infecção por HPV. Estes dados estão em conformidade com o presente estudo, no qual mulheres com a CST IV, característica de VB apresentaram sangramentos, mioma e tiveram que realizar a histerectomia. O que também justifica o aparecimento da lesão, presente na mulher da amostra 34, já que a CST IV tem relação com a persistência da infecção que leva ao desenvolvimento da lesão (GAO *et al.*, 2013).

De acordo com (GAJER *et al.*, 2012; RAVEL, JACQUES; FORNEY; *et al.*, 2013) CST IV A contém uma proporção modesta de *L. iners* junto com bactérias anaeróbias, como *Streptococcus*, *Anaerococcus* e *Corynebacterium*; enquanto que a IVB tem número maior de bactérias associadas a VB,

*Atopobium*, *Prevotella*, *Sneathia*, *Gardnerella* e *Mobiluncus*. Nosso trabalho encontrou predominância de bactérias relacionadas a CST IV B. A presença de *L. iners* na CST IV está associada a fatores inflamatórios elevados e também deixa o ambiente mais propenso a transição para a CST IV. Um estudo com 65 mulheres HPV positivas e 86 HPV negativas revelou que o HPV foi encontrado em maior abundância com bactérias como *Prevotella*, *Dialister* e *Sneathia*. Isso sugere que a maior diversidade está relacionada a maior aquisição e persistência da infecção por HPV, sendo essa associação também válida com *G. vaginalis*, sendo encontrada em abundância em mulheres que apresentaram lesões. Assim, o tratamento de VB pode reduzir a aquisição de HPV e o desenvolvimento de lesões (CHEE; CHEW; THAN, 2020; PAOLA *et al.*, 2017).

LEE e colaboradores (2013) ao pesquisar amostras cervicais de 68 mulheres, destas 23 eram HPV positivas e 45 HPV negativas, demonstraram que a microbiota das mulheres HPV positivas apresentam uma diversidade alta, com baixa proporção de lactobacilos, quando comparadas com o controle. Ainda encontrou associação de *Sneathia* a mulheres HPV positivas.

BROTMAN e colaboradores (2014) acompanharam 32 mulheres durante 16 semanas, a fim de analisar a diversidade microbiana. Encontraram associação positiva entre CST IV e III as mulheres HPV positivas, sugerindo que microbiota composta por esses microrganismos aumentam o risco de aquisição e persistência da infecção por HPV. Nossos dados sugerem que mulheres que apresentam lesões tendem a ter uma proporção maior de CST III, contribuindo para o surgimento de atipias celulares cervicais.

Mitra e colaboradores (2015) pesquisaram amostras cervicais de 169 mulheres, distribuídas em 92 com HSIL, 52 LSIL, 5 câncer cervical invasivo e 20 mulheres sem lesão. Identificaram três grupos de CST's: I, III e IV. O trabalho sugere que *Sneathia*, *Peptostreptococcus* e *Anaerococcus* podem atuar como biomarcadores de HSIL, e que a presença dessas bactérias sugere um prognóstico pior, com possível progressão das lesões. Esses dados estão de acordo com o presente estudo.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta prevalência de HPV evidencia a importância do exame preventivo para o diagnóstico precoce de alterações celulares, da vacinação e principalmente da necessidade do uso de preservativo nas relações sexuais.

A infecção por HPV é considerada uma condição necessária tanto para o desenvolvimento de lesões quanto na progressão das mesmas. Entretanto, o câncer tem caráter multifatorial, com componentes genéticos, ambientais, hormonais, imunológicos, alimentares, comportamentais, entre outros. Nesse contexto, a microbiota vaginal também é um cofator relacionado a infecção e o desenvolvimento de alterações celulares. Estudar e compreender a dinâmica da microbiota vaginal é de extrema importância para a promoção de saúde, diagnóstico precoce e acompanhamento individualizado, uma vez que cada mulher apresenta uma composição da microbiota única.

O Kit prognóstico de câncer de colo do útero visa a promoção da saúde, com acompanhamento médico personalizado. O que reduzirá a mortalidade e os gastos com internações e tratamento, uma vez que cada paciente terá um diagnóstico precoce com uma intervenção rápida e eficaz, no caso de mudanças na microbiota vaginal que podem levar ao desenvolvimento de alterações celulares cervicais.

## 8. CONCLUSÕES

- Embora o HPV possa estar associado a qualquer faixa etária, ele está mais relacionado a mulheres adultas, na faixa etária entre 26 a 35 anos.
- As mulheres sexualmente ativas, com mais de um parceiro estão mais propensas à infecção por HPV.
- A maioria das mulheres apresentou infecção por HPV, tanto monoinfecção por HPV 16 ou 18 quanto coinfeção.
- A avaliação da estrutura da comunidade bacteriana vaginal revelou que a microbiota vaginal pode ser dividida em grupos: CST I, II e IV.
- Mulheres que apresentam infecção produtiva apresentam maior diversidade microbiana, com aumento das bactérias biomarcadoras.
- . O Kit prognóstico de câncer do colo do útero permite acompanhamento médico personalizado, uma vez que compreende a dinâmica da microbiota vaginal e assim, permite realizar intervenções no tratamento de forma precoce, promovendo saúde.

## REFERÊNCIAS

ADEFUYE, Anthonio; SALES, Kurt. Regulation of Inflammatory Pathways in Cancer and Infectious Disease of the Cervix. **Scientifica** v. 2012, n. Figure 1, p. 1–8 , 2012.

ALMONTE, Maribel *et al.* Cervical screening by visual inspection, HPV testing, liquid-based and conventional cytology in Amazonian Peru. **International Journal of Cancer** v. 121, n. 4, p. 796–802 , 2007.

ALVES, Patricia *et al.* Gardnerella vaginalis Outcompetes 29 other bacterial species isolated from patients with bacterial vaginosis, using in an in vitro biofilm formation model. **Journal of Infectious Diseases** v. 210, n. 4, p. 593–596 , 2014.1537-6613r0022-1899.

ARBYN, M. *et al.* *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Second edition-summary document* .**Annals of Oncology**. [S.l.]: Oxford University Press. , 1 mar. 2010

ARBYN, Marc *et al.* Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: A summary of meta-analyses. **Vaccine** v. 24, n. SUPPL. 3, p. 78–89 , 2006.0264-410X (Print).

BAHRAMI, Afsane *et al.* Genetic susceptibility in cervical cancer: From bench to bedside. **Journal of Cellular Physiology** v. 233, n. 3, p. 1929–1939 , 2018.9851138002.

BARRETO ALVES, Jose Antonio *et al.* Pap smears: Frequency of Gardnerella vaginalis, Candida spp., Trichomonas vaginalis and pill use or copper intrauterine device use. **International Archives of Medicine** p. 1–6 , 2016. Disponível em: <<http://imed.pub/ojs/index.php/iam/article/view/1830>>.

BOBEK, Vladimir *et al.* A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. **Anticancer Research** v. 30, n. 12, p. 4799–4804 , 2010.2891321006.

*Brotherton,2019*. . [S.l: s.n.]. , [S.d.]

BROTMAN, Rebecca M. *et al.* Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. **Journal of Infectious Diseases** v. 210, n. 11, p. 1723–1733 , 2014.1537-6613; 0022-1899.

BROTMAN, Rebecca M. Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: An epidemiologic perspective. **Journal of Clinical Investigation** v. 121, n. 12, p. 4610–4617 , 2011.1558-8238 (Electronic)r0021-9738 (Linking).

CALIFF, Robert M. Biomarker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine** v. 243, n. 3, p. 213–221 , 2018.

CHAN, Chee Kai *et al.* Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination - Review of Current Perspectives. **Journal of Oncology** v. 2019 , 2019.

CHAO, Xiao Pei *et al.* Correlation between the diversity of vaginal microbiota

and the risk of high-risk human papillomavirus infection. **International Journal of Gynecological Cancer** v. 29, n. 1, p. 28–34 , 2019.

CHEE, Wallace Jeng Yang; CHEW, Shu Yih; THAN, Leslie Thian Lung. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. **Microbial Cell Factories** v. 19, n. 1, p. 1–24 , 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01464-4>>.1293402001464.

*cohen,2019.* . [S.l: s.n.]. , [S.d.]

COLPANI, Verônica *et al.* **Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis.** [S.l: s.n.], 2020.

COLPANI, Verônica *et al.* Prevalence of papillomavirus in Brazil: A systematic review protocol. **BMJ Open** v. 6, n. 11, p. 10–13 , 2016.

CUNHA, Diana V. *et al.* Mechanistic Insights Underlying Tolerance to Acetic Acid Stress in Vaginal *Candida glabrata* Clinical Isolates. **Frontiers in Microbiology** v. 8, n. February, p. 1–13 , 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00259/full>>.

CUSCHIERI, Kate *et al.* Performance of a cartridge-based assay for detection of clinically significant human papillomavirus (hpv) infection: Lessons from Valgent (Validation of HPV Genotyping Tests). **Journal of Clinical Microbiology** v. 54, n. 9, p. 2337–2342 , 2016.

DE SANJOSÉ, Silvia *et al.* Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. **European Journal of Cancer** v. 49, n. 16, p. 3450–3461 , 2013.1879-0852 (Electronic)r0959-8049 (Linking).

DEL RÍO-OSPINA, Luisa *et al.* The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions. **BMC Cancer** v. 15, n. 1, p. 1–11 , 2015.

DELGADO-DIAZ, David J. *et al.* Distinct Immune Responses Elicited From Cervicovaginal Epithelial Cells by Lactic Acid and Short Chain Fatty Acids Associated With Optimal and Non-optimal Vaginal Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** v. 9, n. January, p. 1–13 , 2020.

DILLNER, J. *et al.* Monitoring of human papillomavirus vaccination. **Clinical and Experimental Immunology** v. 163, n. 1, p. 17–25 , 2011.

DOMINGUEZ-BELLO, M G *et al.* Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. **Nat Med** v. 22, n. 3, p. 250–253 , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26828196>>.1546-170X (Electronic)r1078-8956 (Linking).

DOORBAR, John *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine** v. 30, n. SUPPL.5, p. F55–F70 , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>>.1873-2518 (Electronic)r0264-410X (Linking).

DU, Shengye *et al.* Applying Serum Proteins and MicroRNA as Novel Biomarkers for Early-Stage Cervical Cancer Detection. **Scientific Reports** v.

10, n. 1, p. 20–22 , 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-65850-z>>.

DUENSING, Stefan; MÜNGER, Karl. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. **Oncogene** v. 21, n. 40, p. 6241–6248 , 2002.0950-9232 (Print)n0950-9232 (Linking).

FAURE, Emmanuel *et al.* Vaginal Mucosal Homeostatic Response May Determine Pregnancy Outcome in Women With Bacterial Vaginosis: A Pilot Study. **Medicine** v. 95, n. 5, p. e2668 , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26844497>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4748914>>.0000000000.

FERNANDES, José Veríssimo *et al.* *Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review)* .**Oncology Letters**. [S.l.]: Spandidos Publications. , 1 mar. 2015

FERRECCIO, Catterina *et al.* Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention** v. 13, n. 12, p. 2271–2276 , 2004.

FOXMAN, Betsy *et al.* Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. **Journal of lower genital tract disease** v. 17, n. 3, p. 340–345 , 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23486072>>.

GAJER, Pawel *et al.* Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. **Science translational medicine** v. 4, n. 132, p. 132ra52 , 2012. Disponível em: <<http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/4/132/132ra52.full>>.1946-6242 (Electronic)n1946-6234 (Linking).

GALLO, G *et al.* Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. **Journal of clinical pathology** v. 56, n. 7, p. 532–536 , 2003.0021-9746 (Print)n0021-9746 (Linking).

GONG, Zheng *et al.* Lactobacilli Inactivate Chlamydia trachomatis through Lactic Acid but Not H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **PLoS ONE** v. 9, n. 9, p. 1–12 , 2014.

HAGGERTY, Catherine L. *et al.* Identification of novel microbes associated with pelvic inflammatory disease and infertility. **Sexually Transmitted Infections** v. 92, n. 6, p. 441–446 , 2016.

HORVATH, Caroline a J *et al.* Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology journal** v. 7, p. 11 , 2010.1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking).

HPVCENTER; HPVCENTER. **II. Complementary data on cervical cancer prevention Figure 2. Estimated coverage of cervical cancer screening in Brazil, by age and study.** [S.l: s.n.], [S.d.]. Disponível em: <[www.hpvcentre.net](http://www.hpvcentre.net)>.

INCA. DADOS E NÚMEROS SOBRE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO Relatório Anual 2022 Acesse : [www.inca.gov.br/utero](http://www.inca.gov.br/utero) Rio de Janeiro. p. 28 , 2022.

INCA. **Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil.** [S.l: s.n.], 2015. 1–

126 p. .78-85-7318-283-5.

INCA2016. **Força das recomendações**. [S.l: s.n.], [S.d.].

KALIA, Namarta; SINGH, Jatinder; KAUR, Manpreet. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: A critical review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials** v. 19, n. 1, p. 1–19 , 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>>.

*kops2021*. . [S.l: s.n.]. , [S.d.]

KWASNIEWSKI, Wojciech *et al.* Microbiota dysbiosis is associated with HPV-induced cervical carcinogenesis. **Oncology Letters** v. 16, n. 6, p. 7035–7047 , 2018.

LEE, Jung Eun *et al.* Association of the Vaginal Microbiota with Human Papillomavirus Infection in a Korean Twin Cohort. **PLoS ONE** v. 8, n. 5 , 2013.1932-6203; 1932-6203.

LING, Zongxin *et al.* Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. **BMC genomics** v. 11, n. 1, p. 488 , 2010. Disponível em: <<http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-488>>.8657187072577.

LIU, Yi *et al.* Discovery of key genes as novel biomarkers specifically associated with HPV-negative cervical cancer. **Molecular Therapy - Methods and Clinical Development** v. 21, p. 492–506 , 11 jun. 2021.

LOUIS, Petra; HOLD, Georgina L.; FLINT, Harry J. *The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer*. **Nature Reviews Microbiology**. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 11 out. 2014

LU, Xuerong *et al.* Analysis of influencing factors of viral load in patients with high-risk human papillomavirus. **Virology Journal** v. 18, n. 1, p. 1–8 , 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12985-020-01474-z>>.

LUDWIG, Joseph A.; WEINSTEIN, John N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. **Nature Reviews Cancer** v. 5, n. 11, p. 845–856 , 2005.

MAGALHÃES, Andreia Patrícia *et al.* RNA-based qPCR as a tool to quantify and to characterize dual-species biofilms. **Scientific Reports** v. 9, n. 1, p. 1–12 , 2019.

MAHMOODI, Pegah *et al.* Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: A systematic review. v. 00, p. 1–17 , 2018.

MALAGUTI, Natália *et al.* Sensitive Detection of Thirteen Bacterial Vaginosis-Associated Agents Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. **BioMed research international** v. 2015, p. 645853 , 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/645853/>>%5Cn<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26078959>>%5Cn<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4452834>>.

MARDIS, Elaine R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature** v. 470, n. 7333, p. 198–203 , 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nature09796>>.

MARTÍN, Rebeca *et al.* La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** v. 26, n. 3, p. 160–167 , 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1157/13116753>>.0213-005X.

MARTÍN, Rebeca *et al.* The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. **Virulence** v. 5, n. 3, p. 413–23 , 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3979869&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.2150-5608 (Electronic)r2150-5594 (Linking).

MARTINS, Toni Ricardo; OLIVEIRA, Cristina Mendes De; *et al.* HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions : correlation to cytological data. p. 1–9 , 2016.

MARTINS, Toni Ricardo; MENDES DE OLIVEIRA, Cristina; *et al.* HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. **Virology journal** v. 13, n. 1, p. 138 , 2016. Disponível em: <<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-016-0594-3>>  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27515763>>  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed-central.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4982268](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/central.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4982268)>.

MASTROMARINO, Paola; VITALI, Beatrice; MOSCA, Luciana. Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. **The new microbiologica** v. 36, p. 229–38 , 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912864>>.1121-7138 (Print)r1121-7138 (Linking).

MENEZES, Camila Braz; FRASSON, Amanda Piccoli; TASCA, Tiana. Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide ? v. 3, n. 9, p. 404–418 , 2016.

MITRA, A *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. **Scientific reports** v. 5, n. November, p. 16865 , 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574055>>  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed-central.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4648063](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/central.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4648063)>.

MITRA, Anita *et al.* The vaginal microbiota , human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia : what do we know and where are we going next ? **Microbiome** p. 1–15 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40168-016-0203-0>>.

MOODY, Cary A; LAIMINS, Laimonis A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer** v. 10, n. 8, p. 550–560 , 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2886>>  
<<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2886>>.1474-1768 (Electronic)r1474-175X (Linking).

MORENA, Mariana; SANTOS, De Vieira. “ JÚLIO DE MESQUITA FILHO ” Mariana Morena de Vieira Santos Greatti Flora intermediária em mulheres em

idade reprodutiva : aspectos inflamatórios , atividade de sialidasas e carga bacteriana Mariana Morena de Vieira Santos Greatti Flora intermediária em m. , 2014.

MÜHR, Laila Sara Arroyo *et al.* Human papillomavirus detection by whole-genome next-generation sequencing: Importance of validation and quality assurance procedures. **Viruses** v. 13, n. 7 , 1 jul. 2021.

MUÑOZ, N *et al.* Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. **British journal of cancer** v. 100, n. 7, p. 1184–90 , 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2669994&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.1532-1827 (Electronic).

MUÑOZ, Nubia *et al.* Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine** v. 24, n. SUPPL. 3, p. 1–10 , 2006.0264-410X (Print)r0264-410X (Linking).

NAGASHIMA, Masahito; YAMAGISHI, Yuka; MIKAMO, Hiroshige. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from the patients with vaginal candidiasis. **Journal of Infection and Chemotherapy** v. 22, n. 2, p. 124–126 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2015.08.008>>.

ÑAHUI PALOMINO, Rogers A. *et al.* Vaginal lactobacillus inhibits HIV-1 replication in human tissues ex vivo. **Frontiers in Microbiology** v. 8, n. MAY, p. 1–11 , 2017.

NARDIS, C; MOSCA, L; MASTROMARINO, P. Vaginal microbiota and viral sexually transmitted diseases. **Ann Ig** v. 25, n. 5, p. 443–456 , 2013.1120-9135 (Print)r1120-9135 (Linking).

NAVIDSHAD, Bahman; LIANG, Juan Boo; JAHROMI, Mohammad Faseleh. Correlation coefficients between different methods of expressing bacterial quantification using real time PCR. **International Journal of Molecular Sciences** v. 13, n. 2, p. 2119–2132 , 2012.6038947213.

NELSON, Karen E. Human Papillomavirus Community in Healthy Persons , Defined by Metagenomics Analysis of Human Microbiome Project Shotgun Sequencing Data Sets. v. 88, n. 9, p. 4786–4797 , 2014.

O'HANLON, Deirdre E.; MOENCH, Thomas R.; CONE, Richard A. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. **BMC Infectious Diseases** v. 11 , 2011.

OJALA, Teija *et al.* Comparative genomics of *Lactobacillus crispatus* suggests novel mechanisms for the competitive exclusion of *Gardnerella vaginalis*. **BMC Genomics** v. 15, p. 1–21 , 2014.1471216415107.

OLIVEIRA, Muse Santiago; MEDEIROS, Francisco das Chagas; ELEUTÉRIO JUNIOR, José. Infertility and vaginal microbiome : review study. **Dst** v. 31, n. 7, p. 24–29 , 2019.

ONDERDONK, Andrew B; DELANEY, Mary L; FICHOROVA, N. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. **Clinical Microbiology Reviews** v. 29, n. 2, p. 223–238 , 2016.

ØVESTAD, Irene Tveiters *et al.* Local immune response in the

microenvironment of CIN2-3 with and without spontaneous regression. **Modern Pathology** v. 23, n. 9, p. 1231–1240 , set. 2010.

OYERVIDES-MUÑOZ, Mariel A. *et al.* Multiple HPV infections and viral load association in persistent cervical lesions in Mexican women. **Viruses** v. 12, n. 4 , 2020.

PAOLA, Monica Di *et al.* Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection.

**Scientific Reports** n. May, p. 1–12 , 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>>.

PERES, A. L. *et al.* Molecular analysis and conventional cytology: Association between HPV and bacterial vaginosis in the cervical abnormalities of a Brazilian population. **Genetics and Molecular Research** v. 14, n. 3, p. 9497–9505 , 2015.

PETROVA, Mariya I. *et al.* Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. **FEMS Microbiology Reviews** v. 37, n. 5, p. 762–792 , 2013.1574-6976 (Electronic)n0168-6445 (Linking).

PLESNIARSKI, Andrew; SIDDIK, Abu Bakar; SU, Ruey Chyi. *The Microbiome as a Key Regulator of Female Genital Tract Barrier Function* .**Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 17 dez. 2021

RAHMAT, Frhana *et al.* Human Papillomavirus (HPV) Prevalence and Type Distribution in Urban Areas of Malaysia. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** v. 22, n. 9, p. 2969–2975 , 2021.

RANDELOVIĆ, Gordana *et al.* Microbiological aspects of vulvovaginitis in prepubertal girls. **European Journal of Pediatrics** v. 171, n. 8, p. 1203–1208 , 2012.1432-1076 (Electronic) 0340-6199 (Linking).

RAVEL, J. *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 108, n. Supplement\_1, p. 4680–4687 , 2011. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1002611107>>.0891243208.

RAVEL, Jacques; BROTMAN, Rebecca M; *et al.* Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis.

**Microbiome** v. 1, n. 1, p. 29 , 2013. Disponível em:

<<http://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2049-2618-1-29>>.2049-2618 (Electronic)r2049-2618 (Linking).

RAVEL, Jacques; FORNEY, Larry J; *et al.* Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. **Microbiome** v. 1, n. 1, p. 1–6 , 2013.

RESENDE, Leandro S.D.A. *et al.* A portrait of single and multiple HPV type infections in Brazilian women of different age strata with squamous or glandular cervical lesions. **BMC Infectious Diseases** v. 14, n. 1 , 2014.1471-2334 (Electronic) 1471-2334 (Linking).

ROBB, Melissa A.; MCINNES, Pamela M.; CALIFF, Robert M. Biomarkers and

surrogate endpoints: Developing common terminology and definitions. **JAMA - Journal of the American Medical Association** v. 315, n. 11, p. 1107–1108 , 2016.

RODEN, Richard; WU, T-C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? **Nature reviews. Cancer** v. 6, n. 10, p. 753–63 , 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3181152&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.1474-175X (Print).

SAFAEIAN, Mahboobeh; SOLOMON, Diane; CASTLE, Philip E. *Cervical Cancer Prevention-Cervical Screening: Science in Evolution* .**Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**. [S.l: s.n.]. , dez. 2007

SAND, Freja Lærke *et al.* The prognostic value of p16 and p53 expression for survival after vulvar cancer: A systematic review and meta-analysis. **Gynecologic Oncology** v. 152, n. 1, p. 208–217 , 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.10.015>>.

SCHILLER, John T; DAVIES, Philip. Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. **Nature reviews. Microbiology** v. 2, n. 4, p. 343–347 , 2004.1740-1526.

SCHMITZ, Martina *et al.* Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. **Journal of Clinical Virology** v. 44, n. 4, p. 302–307 , 2009.

SEVALHO, Gil; SEVALHO, Gil. O conceito de vulnerabilidade e a educação em saúde fundamentada em Paulo Freire. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação** n. 0, p. 0–0 , 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1414-32832017005007103&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-32832017005007103&lng=pt&tlng=pt)>.

SFANOS, Karen S. *et al.* *The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development* .**Nature Reviews Urology**. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 jan. 2018

SHIPITSYNA, Elena *et al.* Composition of the Vaginal Microbiota in Women of Reproductive Age - Sensitive and Specific Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis Is Possible? **PLoS ONE** v. 8, n. 4, p. 1–10 , 2013.1932-6203 (Electronic)n1932-6203 (Linking).

SKROUPI, C. *et al.* Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Athens, Greece. **Epidemiology and Infection** v. 135, n. 6, p. 943–950 , 2007.

SMITH, William L. *et al.* Cervical and vaginal flora specimens are highly concordant with respect to bacterial vaginosis-associated organisms and commensal Lactobacillus species in women of reproductive age. **Journal of Clinical Microbiology** v. 52, n. 8, p. 3078–3081 , 2014.

SO, Kyeong A. *et al.* Changes of vaginal microbiota during cervical carcinogenesis in women with human papillomavirus infection. **PLoS ONE** v. 15, n. 9 September, p. 1–10 , 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0238705>>.1111111111.

- STEENBERGEN, Renske D M *et al.* Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. **Nature reviews. Cancer** v. 14, n. 6, p. 395–405 , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24854082>>.doi:10.1038/nrc3728.
- STEVENSON, David M.; WEIMER, Paul J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 75, n. 1, p. 165–174 , maio 2007.
- STRIMBU, Kyle; TAVEL, Jorge A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS** v. 5, n. 6, p. 463–466 , 2010.
- TANG, Shuang Yang *et al.* HPV Prevalence and Genotype Distribution Among Women From Hengyang District of Hunan Province, China. **Frontiers in Public Health** v. 9, n. November, p. 1–9 , 2021.
- THOMAS, M *et al.* Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. **Oncogene** v. 27, n. 55, p. 7018–7030 , 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029942>>.1476-5594 (Electronic)r0950-9232 (Linking).
- USYK, Mykhaylo *et al.* Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study. **PLoS Pathogens** v. 16, n. 3 , 2020.
- VALIYA, Lalji G; BAXI, Seema N. Application of Bethesda system for conventional cervical cytology : a study of 340 cases. v. 3, n. 9, p. 2252–2258 , 2015.
- VALLOR, Ana C. *et al.* Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: Role of hydrogen peroxide production. **Journal of Infectious Diseases** v. 184, n. 11, p. 1431–1436 , 2001.
- VERMA, Indu. Application of Bethesda System for Cervical Cytology in Unhealthy Cervix. **Journal of Clinical and Diagnostic Research** v. 8, n. 9 , 2014. Disponível em: <[http://jcdr.net/article\\_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2014&volume=8&issue=9&page=OC26&issn=0973-709x&id=4893](http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2014&volume=8&issue=9&page=OC26&issn=0973-709x&id=4893)>.
- W., Gao *et al.* Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: A cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases** v. 13, n. 1 , 2013. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L52629677%0Ahttp://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-271%0Ahttp://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/271>>.
- WAGNER, Monika *et al.* Global availability of data on HPV genotype-distribution in cervical, vulvar and vaginal disease and genotype-specific prevalence and incidence of HPV infection in females. **Infectious agents and cancer** v. 10, p. 13 , 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4435914&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.17509378 (ISSN).
- WANG, Wei *et al.* Association between viral loads of different oncogenic human papillomavirus types and the degree of cervical lesions in the progression of

cervical Cancer. **Clinica Chimica Acta** v. 483, n. April, p. 249–255 , 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.05.016>>.

WENDLAND, Eliana Marcia *et al.* Prevalence of HPV infection among sexually active adolescents and young adults in Brazil: The POP-Brazil Study. **Scientific Reports** v. 10, n. 1, p. 1–10 , 2020.

WILLIAM, Wasswa *et al.* A review of image analysis and machine learning techniques for automated cervical cancer screening from pap-smear images .**Computer Methods and Programs in Biomedicine**. [S.l.]: Elsevier Ireland Ltd. , 1 out. 2018

WILLIAMS, Jordana; KOSTIUK, Morris; BIRON, Vincent L. *Molecular Detection Methods in HPV-Related Cancers* .**Frontiers in Oncology**. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 27 abr. 2022

WOODMAN, C.; *et al.* The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues - ProQuest. **Nature Reviews Cancer** v. 7, n. January, p. 11–22 , 2007. Disponível em:

<<http://www.ulib.niu.edu:2205/docview/275099916/fulltextPDF/F29ABC7210B746CEPQ/18?accountid=12846>>.1474-175X (Print)r1474-175X (Linking).

YAMAGUCHI, Akihiro *et al.* Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluorometry for screening of cervical cancer. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry** v. 318, n. 1–2, p. 41–9 , 2002a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880111>>.

YAMAGUCHI, Akihiro *et al.* Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluorometry for screening of cervical cancer. **Clinica Chimica Acta** v. 318, n. 1–2, p. 41–49 , 2002b.

ZHOU, Yilu *et al.* Correlation between human papillomavirus viral load and cervical lesions classification: A review of current research. **Frontiers in Medicine** v. 10, n. February, p. 1–6 , 2023.

ZOZAYA-HINCHLIFFE, Marcela *et al.* Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology** v. 48, n. 5, p. 1812–1819 , 2010.

ZUNA, Rosemary E *et al.* Distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc** v. 20, n. 2, p. 167–174 , 2007. Disponível em:

<<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17192793&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/modpat.hol.3800723>>.0893-3952 (Print)r0893-3952 (Linking).

ZUR HAUSEN, Harald. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology** v. 384, n. 2, p. 260–265 , 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>>.1096-0341 (Electronic)n0042-6822 (Linking).

*et al.* Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. **Chinese Journal of Cancer Research** v. 32, n. 6, p. 720–728 , 2020.

## ANEXO I



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DETECÇÃO DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) E ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA NO ECOSISTEMA VAGINAL DE MULHERES COM ATÍPIAS CELULARES CERVICAIS

**Pesquisador:** Vânia Lúcia Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 44545715.5.0000.5147

**Instituição Proponente:** Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.297.680

#### **Apresentação do Projeto:**

Apresentação do projeto está clara e detalhada de forma objetiva. Descreve as bases científicas que justificam o estudo.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Apresenta clareza e compatibilidade com a proposta de estudo.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O risco que o projeto apresenta é caracterizado como risco mínimo, considerando que os indivíduos não sofrerão qualquer dano ou sofrerão prejuízo pela participação ou pela negação de participação na pesquisa e benefícios esperados, estão adequadamente descritos.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS.

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

1) Além da Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, favor acrescentar no TCLE a

**Endereço:** JOSE LOURENCO KELMER S/N  
**Bairro:** SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900  
**UF:** MG **Município:** JUIZ DE FORA  
**Telefone:** (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@uff.edu.br



Continuação do Parecer: 1.297.680

resolução 441/11 e a Portaria 2.201/11 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares.

**Recomendações:**

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

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido nas Resoluções: 466/12 - 441/11; com a Norma Operacional Nº 001/2013; e com a portaria 2.201/11 do Conselho Nacional de Saúde - CNS, Data prevista para o término da pesquisa: Março de 2020.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas nas Resoluções: 466/12 - 441/11; com a Norma Operacional Nº 001/2013; e com a portaria 2.201/11 do Conselho Nacional de Saúde - CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_494217.pdf	17/06/2015 15:02:09		Aceito
Outros	Termo de outorga CBB - APQ-01815-13.pdf	17/06/2015 14:52:55		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_494217.pdf	17/06/2015 12:06:24		Aceito
Outros	carta Prefeitura.jpg	17/06/2015 12:05:28		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Biorepositório.doc	17/06/2015 12:01:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto HPV para CEP versão.doc	17/06/2015 11:58:19		Aceito
Outros	Biorrepositório.pdf	30/04/2015 13:34:01		Aceito

**Endereço:** JOSE LOURENCO KELMER S/N

**Bairro:** SAO PEDRO

**CEP:** 36.036-900

**UF:** MG

**Município:** JUIZ DE FORA

**Telefone:** (32)2102-3788

**Fax:** (32)1102-3788

**E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 1.297.680

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_494217.pdf	30/04/2015 11:15:28		Aceito
Outros	ANEXO II - Instrumento de coleta de dados.doc	30/04/2015 11:06:01		Aceito
Outros	ANEXO I.doc	30/04/2015 11:05:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE-Termo-de-Consentimento-Livre-Esclarecido-24-02-15.doc	30/04/2015 11:04:07		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_494217.pdf	29/04/2015 15:16:53		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_494217.pdf	29/04/2015 15:14:34		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.jpg	29/04/2015 15:06:59		Aceito
Outros	carta Didier.pdf	29/04/2015 14:26:26		Aceito
Outros	Termo-de-sigilo.doc	22/04/2015 12:13:22		Aceito
Outros	declaração claudio.jpg	22/04/2015 12:12:59		Aceito
Outros	declaração ana paula.jpg	22/04/2015 12:12:47		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JUIZ DE FORA, 27 de Outubro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Francis Ricardo dos Reis Justi**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** JOSE LOURENCO KELMER S/N  
**Bairro:** SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900  
**UF:** MG **Município:** JUIZ DE FORA  
**Telefone:** (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br

## ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF  
36036-900 JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Detecção do papilomavirus humano (HPV) e estudo da diversidade microbiana no ecossistema vaginal de mulheres com atipias celulares cervicais**”. Nesta pesquisa, pretendemos gerar conhecimentos sobre a presença do Papilomavirus humano (HPV), que é o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras do câncer do colo do útero, em amostras de secreção vaginal de mulheres com atipias celulares cervicais, sugestivas de lesão por HPV, além de avaliar a diversidade bacteriana e fúngica do ecossistema vaginal. O motivo que nos leva a estudar este assunto é para ampliar os conhecimentos sobre a relação entre o HPV e outras doenças cérvico-vaginais, tais como a vaginose bacteriana e a candidíase vulvo-vaginal, que constituem um problema clínico comum e um dos principais motivos que levam as mulheres a procurar o serviço ginecológico.

As participantes voluntárias não serão submetidas a nenhum procedimento clínico que ofereça riscos físicos ou dolorosos. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: uma amostra de secreção vaginal será colhida pelo uso de um cotonete e/ou escovinha esterilizada na vagina durante sua consulta ginecológica de rotina, e a secreção das pacientes será transportada em tubos estéreis contendo tampão, que serão enviados ao laboratório de microbiologia. Considerada pesquisa de risco mínimo, eventuais desconfortos emocionais serão minimizados, uma vez que as amostras serão coletadas pelo seu médico ginecologista durante os exames ginecológicos que são realizados rotineiramente. A pesquisa contribuirá para formular ações para uma diminuição de riscos associados ao uso incorreto dos medicamentos e estimular os exames preventivos das doenças cérvico-vaginais. Para participar deste estudo o Sr (a) não terá nenhum custo nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito a indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF**, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa "**Detecção do papilomavirus humano (HPV) e estudo da diversidade microbiana no ecossistema vaginal de mulheres com atipias celulares cervicais**", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 .

---

Nome	Assinatura participante	Data
------	-------------------------	------

---

Nome	Assinatura pesquisador
Data	

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

*PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dra. Vânia Lúcia da Silva*

*ENDEREÇO: ICB/Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Avenida José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário, Bairro São Pedro*

*CEP:36036-900 – JUIZ DE FORA – MG*

*FONE: (32) 2102-3213.*

*E-MAIL: [vania.silva@ufff.edu.br](mailto:vania.silva@ufff.edu.br)*

*Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o CEP COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFJF - CAMPUS UNIVERSITÁRIO DA UFJF -PRÓ-REITORIA DE PESQUISA*

*CEP 36036.900*

*FONE: 32 3229 3788*

## ANEXO III

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/UFJF

36036-900 JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Biorrepositório)

O sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa "**Detecção do papilomavirus humano (HPV) e estudo da diversidade microbiana no ecossistema vaginal de mulheres com atipias celulares cervicais**". Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano do tipo **secreção vaginal**, cuja utilização está **expressamente** vinculada somente a esse projeto de pesquisa. Nesta pesquisa pretendemos ampliar os conhecimentos sobre a relação entre o HPV e outras doenças cérvico-vaginais, tais como a vaginose bacteriana e a candidíase vulvo-vaginal, que constituem um problema clínico comum e um dos principais motivos que levam as mulheres a procurar o serviço ginecológico. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: uma amostra de secreção vaginal será colhida pelo uso de um cotonete e/ou escovinha esterilizada na vagina durante sua consulta ginecológica de rotina, e essa secreção será transportada em tubos estéreis contendo tampão, que serão enviados ao laboratório de microbiologia. As amostras serão congeladas em freezer até o processamento. Após o processamento dessa secreção, que consiste na extração de DNA total, todas as amostras serão destruídas por autoclavagem. Considerada pesquisa de risco mínimo, eventuais desconfortos emocionais serão minimizados, uma vez que as amostras serão coletadas pelo seu médico ginecologista durante os exames ginecológicos que são realizados rotineiramente. A pesquisa contribuirá para minimizar os gastos com terapia empírica para algumas doenças cérvico-vaginais, além de estimular que os exames preventivos sejam feitos rotineiramente. Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF**, e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa "**Detecção do papilomavirus humano (HPV) e estudo da diversidade microbiana no ecossistema vaginal de mulheres com atipias celulares cervicais**", de maneira clara e detalhada e

esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 .

---

Nome	Assinatura participante	Data
------	-------------------------	------

---

Nome	Assinatura pesquisador	Data
------	------------------------	------

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dra. Vânia Lúcia da Silva  
ENDEREÇO: ICB/Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Avenida José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário, Bairro São Pedro  
CEP:36036-900 – JUIZ DE FORA – MG  
FONE: (32) 2102-3213.  
E-MAIL: [vania.silva@ufff.edu.br](mailto:vania.silva@ufff.edu.br)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o CEP COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFJF - CAMPUS UNIVERSITÁRIO DA UFJF -PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
CEP 36036.900  
FONE: 32 3229 3788

## ANEXO IV

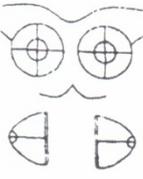
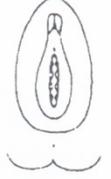
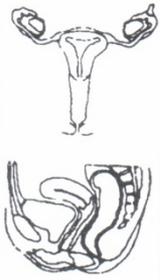
SUS - JF  
Secretaria Municipal de Saúde  
INSTITUTO DA MULHER



## FICHA CLÍNICA DA MULHER

**Consultório**

Nome: _____		Profissão: _____	
Idade: _____		Nº: _____	
Idade: _____		Data: _____	
Cor: _____		Naturalidade: _____	
Queixa Principal: _____			
Hist. da Doença atual: _____		Menarca: _____ D.U.M.	
_____		Ciclos posteriores: _____	
_____		Método anticoncepcional: _____	
Hist. patológica pregressa (pessoal e familiar):		Gesta: _____ Para: _____ Aborto: _____	
cardiovasculares: _____		Parto Normal: _____ Cesariana: _____	
endócrinas/metabólicas: _____		1º Parto: _____ Útil Parto: _____	
osteoporoze: _____		Aleitamento: _____	
alergia: _____		1º Coito: _____ Nº parceiros: _____	
víroses: _____		Coito anal: _____ Orgasmo: _____	
DST: _____		Medicamentos em uso: _____	
câncer: _____		_____	
cirurgia: _____		_____	
acidentes: _____		Tabagismo: _____ Etilismo: _____	
transusão: _____		Drogas: _____	
outros: _____		Obs: _____	

Peso: _____	Altura: _____	P.A.: _____	ACV: _____	A.R.: _____	Membros inferiores: _____
<b>MAMAS</b> 	Inspeção estática: _____	<b>EXAME ESPECULAR</b> 		Vagina: _____	
	Inspeção dinâmica: _____			Colo: _____	
	Palpação: _____			Muco Cervical: _____	
	Aréola e papila: _____			_____	
	Axilas: _____			_____	
<b>VULVA e PERÍNEO</b> 	Pilosidade: _____	<b>TOQUE</b> 		Vagina: _____	
	Lábios: _____			Colo: _____	
	Clítoris: _____			Útero: _____	
	Meato uretral: _____			Anexo D: _____	
	Gl. Bartholin: _____			Anexo E: _____	
	Himen: _____			Reto: _____	
	Estática pélvica: _____			Parâmetros: _____	
Incontinência urinária: _____	_____				
Obs.: _____	_____				
Addome: _____					
Impressão diagnóstica: _____					
Conduta: _____					

## ANEXO V

 <b>MINISTÉRIO DA SAÚDE</b>		<b>REQUISIÇÃO DE EXAME CITOPATOLÓGICO - COLO DO ÚTERO</b>	
<i>Viva Mulher - Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama</i>			
UF	CNES da Unidade de Saúde		
Unidade de Saúde			
Município			Prontuário
INFORMAÇÕES PESSOAIS			
Cartão SUS			
Nome Completo da Mulher			
Nome Completo da Mãe			
Identidade		Órgão Emissor	UF
Data de Nascimento		Idade	
CNPJ (CPF)		Apelido da Mulher	
Dados Residenciais			
Logradouro			
Número	Complemento		UF
Código do Município	Município	Bairro	UF
CEP	DDD	Telefone	
Ponto de Referência			
ESCOLARIDADE: <input type="checkbox"/> Analfabeta <input type="checkbox"/> 1º Grau Incompleto <input type="checkbox"/> 1º Grau Completo <input type="checkbox"/> 2º Grau Completo <input type="checkbox"/> 3º Grau Completo			
DADOS DA ANAMNESE			
1. Fez o exame preventivo (Papanicolaou) alguma vez? <input type="checkbox"/> Sim. Quando fez o último exame? ano _____ <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe		6. Já fez tratamento por radioterapia? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe	
2. Usa DIU? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe		7. Data da última menstruação / regra: _____/_____/_____. <input type="checkbox"/> Não sabe / Não lembra	
3. Está grávida? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe		8. Tem ou teve algum sangramento após relações sexuais? (não considerar a primeira relação sexual na vida) <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não / Não sabe / Não lembra	
4. Usa pílula anticoncepcional? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe		9. Tem ou teve algum sangramento após a menopausa? (não considerar o(s) sangramento(s) na vigência de reposição hormonal) <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não / Não sabe / Não lembra / Não está na menopausa	
5. Usa hormônio / remédio para tratar a menopausa? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe			
EXAME CLÍNICO			
10. Inspeção do colo <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Ausente (anomalias congênicas ou retirado cirurgicamente) <input type="checkbox"/> Alterado <input type="checkbox"/> Colo não visualizado		11. Sinais sugestivos de doenças sexualmente transmissíveis? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	

ATENÇÃO: Não serão processados os exames que não tiverem o nome, idade, endereço e nome da mãe do paciente preenchidos.

## IDENTIFICAÇÃO DO LABORATÓRIO

CNPJ do Laboratório

Número do Exame

Nome do Laboratório

Recebido em:

## RESULTADO DO EXAME CITOPATOLÓGICO - COLO DO ÚTERO

## AVALIAÇÃO PRÉ-ANALÍTICA

## AMOSTRA REJEITADA POR:

- Ausência ou erro na identificação da lâmina, frasco ou formulário
- Lâmina danificada ou ausente
- Causas alheias ao laboratório; especificar: \_\_\_\_\_
- Outras causas; especificar: \_\_\_\_\_

## EPITÉLIOS REPRESENTADOS NA AMOSTRA:

- Escamoso
- Glandular
- Metaplásico

## ADEQUABILIDADE DO MATERIAL

- Satisfatória
- Insatisfatória para avaliação oncótica devido a:
- Material acelular ou hipocelular em menos de 10% do esfregaço
- Sangue em mais de 75% do esfregaço
- Plócitos em mais de 75% do esfregaço
- Artefatos de dessecação em mais de 75% do esfregaço
- Contaminantes externos em mais de 75% do esfregaço
- Intensa superposição celular em mais de 75% do esfregaço
- Outros

## DIAGNÓSTICO DESCRITIVO

DENTRO DOS LIMITES DA NORMALIDADE, NO MATERIAL EXAMINADO

## ALTERAÇÕES CELULARES BENIGNAS REATIVAS OU REPARATIVAS

- Inflamação
- Metaplasia escamosa imatura
- Reparação
- Atrofia com inflamação
- Radiação
- Outros; especificar: \_\_\_\_\_

## MICROBIOLOGIA

- Lactobacillus sp*
- Cocos
- Sugestivo de *Chlamydia sp*
- Actinomyces sp*
- Candida sp*
- Trichomonas vaginalis*
- Efeito citopático compatível com vírus do grupo *Herpes*
- Bacilos supracitoplasmáticos (sugestivos de *Gardnerella/Mobiluncus*)
- Outros bacilos
- Outros; especificar: \_\_\_\_\_

## CÉLULAS ATÍPICAS DE SIGNIFICADO INDETERMINADO

Escamosas:  Possivelmente não neoplásicas

Não se pode afastar lesão de alto grau

Glandulares:  Possivelmente não neoplásicas

Não se pode afastar lesão de alto grau

De origem indefinida:  Possivelmente não neoplásicas

Não se pode afastar lesão de alto grau

## ATIPIAS EM CÉLULAS ESCAMOSAS

- Lesão intra-epitelial de baixo grau (compreendendo efeito citopático pelo HPV e neoplasia intra-epitelial cervical grau I)
- Lesão intra-epitelial de alto grau (compreendendo neoplasias intra-epiteliais cervicais graus II e III)
- Lesão intra-epitelial de alto grau, não podendo excluir micro-invasão
- Carcinoma epidermóide invasor

## ATIPIAS EM CÉLULAS GLANDULARES

- Adenocarcinoma "in situ"
- Adenocarcinoma invasor:  Cervical
- Endometrial
- Sem outras especificações

OUTRAS NEOPLASIAS MALIGNAS: \_\_\_\_\_

PRESENÇA DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS (NA PÓS-MENOPAUSA OU ACIMA DE 40 ANOS, FORA DO PERÍODO MENSTRUAL)

Observações Gerais: \_\_\_\_\_

Responsável pelo resultado

## ANEXO VI



Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Setor de Microbiologia - ICB

**FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS**

Caso N° |\_|\_|\_|\_|\_| Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Prontuário |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

Nome: \_\_\_\_\_ Idade (anos): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Telefones: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Estado civil:  solteira  casada  outro
2. Cor:  branca  preta  parda  amarela  outra
3. Nível de escolaridade: \_\_\_\_\_
4. Ocupação profissional: \_\_\_\_\_
5. Vida sexual ativa:  não  sim - Parceiros  01  mais de 01
6. Gestante:  não  Sim. Idade Gestacional: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
7. Antibióticos nos últimos 30 dias:  
Antifúngico  sim  não    Antibacteriano  sim  não    Antiprotosoário  sim  não
8. Paciente com história de candidíase vulvovaginal e recorrência:  
 Segundo episódio - Data episódio anterior \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Diagnóstico laboratorial:  não  Sim. Etiologia: \_\_\_\_\_  
 Terceiro episódio - Data episódio anterior \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Diagnóstico laboratorial:  não  Sim. Etiologia: \_\_\_\_\_  
 Outros - Data episódio anterior \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Diagnóstico laboratorial:  não  Sim. Etiologia: \_\_\_\_\_
9. Imunossupressão:  não  sim:  terapia imunossupressora  soropositiva
10. Diabetes:  não  sim:  tipo I  tipo II



---

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Setor de Microbiologia - ICB

11. Pacientes com exame preventivo (Papanicolaou) positivo para bacilos supracitoplasmáticos [ ]  
sim [ ] não
12. Vulvite: [ ] não [ ] sim
13. Vaginite: [ ] não [ ] sim
14. Fluxo:
- a. Cor: [ ] branco [ ] amarelado [ ] esverdeado
- b. Aspecto: [ ] grumoso [ ] fluido
15. Diagnóstico epitelial descritivo (Papanicolaou) – pacientes com atipias celulares [ ] sim [ ]  
não

## ANEXO VII

Tabela 18: valores de referência das mulheres sem lesões.

	<i>L. crispatus</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. jenseni</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Gardnerella</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Sneathia</i>
<b>HPV 16</b>	0,0023 a 0,82	0 a 0,0002	0,0001 a 0,07433	0,0001 a 0,2332	0 a 0,0018	0 a 0,007	0 a 0,1339	0 a 0,0057	0 a 0,100
<b>HPV 18</b>	0,0021 a 0,9330	0 a 0,0358	0 a 0,2679	0 a 0,2176	0 a 0,1093	0 a 0,2871	0 a 0,5743	0 a 0,0502	0 a 0,3522
<b>HPV 16 e 18</b>	0,002 a 0,7578	0 a 0,0042	0 a 0,707	0 a 0,2871	0 a 0,0473	0 a 0,5743	0 a 0,7070	0 a 0,1209	0 a 0,1026

Tabela 19: valores de referência das mulheres com lesões.

	<i>L. crispatus</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. jenseni</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Gardnerella</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Sneathia</i>
<b>HSIL</b>	0	0,02	0	0,0055	0,1095	0,1538	0,3077	0,1538	0,1894

<b>LSIL</b>	0,0071	0,0507	0,0023	0	0	0,0507	0,0044	0,0167	0
<b>ASC H</b>	0,0673	0,0317	0,0012	0,05	0,0059	0,0219	0,0733	0,0335	0
<b>ASC US</b>	0,0898	0,0361	0,0195	0,0225	0,0187	0,0226	0,0536	0,0653	0,0175

## ANEXO VIII

### Valores de referências das cruces do resultado do Kit prognóstico.

- Baseadas nas mulheres saudáveis e doentes.
- Os valores foram divididos em 5. De acordo com o mínimo e máximo encontrado, conforme os exemplos abaixo:

#### *L. crispatus*

\* - 0,0001 a 0,16

\*\* - 0,161 a 0,32

\*\*\* - 0,321 a 0,48

\*\*\*\* - 0,481 a 0,64

\*\*\*\*\* - a partir de 0,641

#### *L. jenseni*

\* 0,05 a 0,1

\*\* 0,11 a 0,15

\*\*\* 0,151 a 0,2

\*\*\*\* 0,21 a 0,25

\*\*\*\*\* a partir de 0,25