

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

**MICHELLE DA SILVA PEREIRA**

**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA VAGINAL NA INCIDÊNCIA DE  
LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS HPV-INDUZIDAS**

**Juiz de Fora**

**2018**

**MICHELLE DA SILVA PEREIRA**

**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA VAGINAL NA INCIDÊNCIA DE  
LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS HPV-INDUZIDAS**

Dissertação do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, na área de Imunologia/DIP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: área Imunologia e Doenças infecto-parasitárias.

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

**Co-orientadora: Profa. Dra. Analice Claudia Azevedo**

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

**Juiz de Fora**

**2018**

Pereira, Michelle da Silva.

Influência da microbiota vaginal na incidência de lesões intraepiteliais cervicais HPV-induzidas / Michelle da Silva Pereira. -2018.

103 p. : il.

Orientadora: Vânia Lúcia da Silva

Coorientadores: Analice Claudia Azevedo, Cláudio Galuppo Diniz

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2018.

1. Microbiota vaginal. 2. HPV. 3. Lesões intraepiteliais cervicais. I. Silva, Vânia Lúcia da , orient. II. Azevedo, Analice Claudia, coorient. III. Diniz, Cláudio Galuppo, coorient. IV. Título.

Dedico essa vitória ao Wander, meu marido, que me incentivou a iniciar, me deu força para continuar e no fim... me deu esperança para prosseguir.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

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

Ao meu amado marido, Wander, pelo incentivo, dedicação, compreensão e por me mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

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.

A Dra. Analice C. Azevedo, minha co-orientadora, cuja a confiança, incentivo e orientação foram fundamentais na realização deste trabalho.

A Dra. Julliane M. Dutra, pela boa vontade de transferir seus conhecimentos, por confirmar que eu estava no caminho certo e incentivo nessa jornada.

Ao Dr. Didier Silveira C. Filho, pela generosidade, paciência e apoio.

As amigas Thaís e Daniele, que foram as primeiras a me auxiliar no laboratório, pela paciência e ensinamento.

A amiga Ana Caroline, pelo apoio, compreensão, amizade e pela experiência que passamos juntas.

Aos amigos Ana Cláudia, Ana Heloísa, Danielle Oliveira, e Bruno, pela contribuição inestimável no decorrer do projeto.

Aos amigos e colegas do Laboratório e Departamento de Microbiologia, em especial a Francis, Thelma, Jéssica, Igor e Vinicius pelas dicas, apoio e compreensão.

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 do câncer cervical. O objetivo do trabalho foi avaliar a diversidade microbiana do ecossistema vaginal de mulheres com e sem atipias celulares cervicais e relacionar com HPV. Fluido vaginal e raspado da cérvix uterina foram coletados (n= 33 sem lesão e n=41 com lesão) e DNA viral e bacteriano foi extraído. Lâminas foram coradas pelo método de Gram, a fim de estabelecer o escore de Nugent para avaliação da VB. Reação de PCR para genotipagem do HPV foi realizado. PCR-DGGE foi realizado para avaliação da estrutura da comunidade bacteriana. A média de idade das mulheres foi de 36 anos; compreendendo 87% (sem lesão) e 92% (com lesão). A análise do escore de Nugent revelou que 51% das mulheres com lesão não apresentavam VB e 29% eram portadoras de VB. O exame de Papanicolaou mostrou que 31% das mulheres apresentavam lesão com células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), seguida de lesão epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e lesão epitelial escamosa de alto grau (HSIL), ambas com 26%, e 14% das mulheres apresentaram lesão com células escamosas atípicas que não permitem excluir lesão de alto grau (ASC-H). HPV foi detectado em 91% das pacientes, sendo identificados 5 tipos do grupo de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 52 e 58). O HPV 16 foi o mais frequente (85%), seguido do HPV 18 (68%). No grupo sem lesão a prevalência da concomitância de HPV 16 e 18 foi de 58% e no grupo com lesão foi de 60%. Na faixa etária de 18 a 30 anos, 43% das mulheres apresentaram HPV 16, e 35% apresentaram coinfeção por HPV 16 e 18. A associação entre a genotipagem e o exame de Papanicolaou mostrou que 40% das pacientes ASC-US e 20% ASC-H apresentaram monoinfeção por HPV 16. Das mulheres com HPV 16 e coinfeção por HPV 16 e 18, VB foi encontrada em 25% das mulheres. Na análise do agrupamento obtido por PCR-DGGE observa-se, com algumas exceções, que os perfis de mulheres com as mesmas condições de saúde (normal, intermediário e com vaginose bacteriana) tenderam a se agrupar, embora em grupos separados. Na análise do agrupamento em relação às atipias, não foi observada a formação de um padrão. Dada a complexidade do ecossistema vaginal, sugere-se a necessidade de técnicas com maior poder de resolução para o entendimento da relação entre o HPV, microbiota vaginal e lesões celulares cervicais.

**Palavras chaves:** Microbiota vaginal, HPV, alterações celulares.

## 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. The aim of this study was to evaluate the microbial diversity of the vaginal ecosystem of women with cervical cellular atypias and carrying HPV. Vaginal fluid and scraped uterine cervix were collected (n = 33 without lesion and n = 41 with lesion) and viral and bacterial DNA was extracted. Glass slides were stained by the Gram method in order to establish the Nugent score for BV evaluation. PCR reaction for HPV genotyping was performed. DGGE-PCR was performed to assess the structure of the bacterial community. The mean age of the women was 36 years; comprising 87% (without lesion) and 92% (with lesion). Analysis of the Nugent score revealed that 51% of the women with lesion did not present BV and 29% had BV. Pap smear test showed that 31% of the women had atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), 26% had low grade squamous epithelial lesion (LSIL), 26% had high grade squamous epithelial lesion (HSIL) and 14% had with atypical squamous cells that do not allow the exclusion of high-grade lesion (ASC-H). HPV was detected in 91% of the patients, being identified 5 types of the high risk group (16, 18, 31, 52 and 58). HPV 16 was the most frequent (85%), followed by HPV 18 (68%). In the non-lesion group, the prevalence of HPV 16 and 18 concomitance was 58% and in the lesion group it was 60%. In the 18-30 age group, 43% of the women had HPV 16, and 35% had coinfection by HPV 16 and 18. The association between genotyping and the Pap smear showed that 40% of ASC-US patients and 20% ASC-H showed mono-infection by HPV 16. Besides, out of women with HPV 16 and coinfection by HPV 16 and 18, BV was found in 25%. In the analysis of the grouping obtained by PCR-DGGE it is observed with some exceptions, that the profiles of women with the same health conditions (healthy, intermediate and with bacterial vaginosis) tended to group, although in separate groups. Analysis of the cluster in relation to the atypia did not observe the formation of a pattern. Given the complexity of the vaginal ecosystem, it is suggested the need for higher resolution power techniques for understanding the relationship between HPV, vaginal microbiota and cervical cellular lesions.

**Key words:** Vaginal microbiota, HPV, cell changes.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais tipos de HPV presentes nas lesões cervicais	33
Tabela 2	Iniciadores utilizados para a detecção do HPV	41
Tabela 3	Iniciador, sequência, tipo viral, tamanho e gene alvo usados no <i>Hemi-nested</i> PCR	42
Tabela 4	Características sócio-demográficas das mulheres participantes do estudo	47
Tabela 5	Características clínicas e comportamentais das mulheres participantes do estudo	48
Tabela 6	Análise univariada da associação entre variáveis comportamentais e clínicas de mulheres sem e com lesão cervical.	50
Tabela 7	Associação entre atipias celulares e o Escore de Nugent	55
Tabela 8	Análise univariada da associação entre a ocorrência de VB e a presença e ausência de atipias celulares	56
Tabela 9	Distribuição dos tipos de HPV de acordo com a faixa etária das mulheres com atipias celulares.	59
Tabela 10	Distribuição dos genótipos de HPV nos tipos de lesão do colo do útero das mulheres com atipias celulares.	60
Tabela 11	Distribuição dos tipos de HPV de acordo com a interpretação do Escore de Nugent das mulheres com e sem atipias celulares.	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do genoma do HPV.	28
Figura 2	Distribuição das participantes do estudo por idade e frequência de observação dos diferentes tipos de lesão de células escamosas por faixa etária.	53
Figura 3	Frequência de diagnóstico (n) de monoinfecção e coinfeção.	57
Figura 4	Frequência de diagnóstico (%) dos genótipos encontrados.	58
Figura 5	Frequência de observação (%) de amostras HPV positivas distribuídas de acordo com seus tipos virais e tipo não detectado	61
Figura 6	Matriz de similaridade resultante da análise de agrupamento UPGMA com coeficiente de Jaccard, do <i>fingerprint</i> dos produtos de amplificação do DNA bacteriano, separados em DGGE, correspondete à região V6 do gene codificador para o RNA16s a partir do metagenoma vaginal das mulheres com e sem atipias celulares cervicais.	65

## 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*

DGGE - eletroforese em gel com gradiente desnaturante

DIU – Dispositivo intrauterino

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

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 Vulvovaginites	21
2.2.1 Diagnóstico de Vulvovaginites	24
2.3 Papilomavirus humano – HPV	26
2.3.1 Atipias escamosas celulares e sua relação com os tipos de HPV	31
2.4 Microbiota e sua relação com o HPV	34
2.5 Técnicas para estudo da diversidade microbiana	35
<b>3. OBJETIVOS</b>	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivo específico	37
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	38
4.1 População amostrada	38
4.2 Coleta do espécime clínico	39
4.3 Exame microscópico direto dos espécimes clínicos	40
4.4 Extração do DNA das amostras de fluido vaginal	40
4.5 Determinação dos genótipos virais do HPV	40
4.5.1 Amplificação da região E6/E7 do genoma viral	41
4.5.2 Genotipagem do HPV	42
4.6 Análise da estrutura da diversidade bacteriana na microbiota vaginal	44

4.6.1 Amplificação de DNAr 16S de representantes do domínio Bacteria	44
4.6.2 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE	45
4.7 Análise estatística	46
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
5.1 Características sócio-demográficas e aspectos clínicos de pacientes atendidas no serviço, de ginecologia público e particular do Município de Juiz de Fora	46
5.2 Avaliação da ocorrência concomitante de vaginose bacteriana (VB) nas amostras de fluido vaginal considerando-se como parâmetro diagnóstico o Escore de Nugent.	53
5.3 Avaliação da presença e genótipos prevalentes do vírus HPV nas amostras de raspados cervicais	56
5.4 Avaliação da estrutura da comunidade bacteriana nas amostras de fluido vaginal das mulheres participantes do estudo	64
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>76</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE I</b> - Classificação das amostras de acordo com o Escore de Nugent	90
<b>ANEXO I</b> - Parecer do comitê de ética em pesquisa- UFJF	91
<b>ANEXO II</b> -Classificação do SUS e da Subsecretaria de Atenção Primária à Saúde, para encaminhamento ao serviço de colposcopia	94

<b>ANEXO IIIA</b> –Termo de consentimento livre e esclarecido	95
<b>ANEXO IIIB</b> –Termo de consentimento livre e esclarecido (biorrepositório)	97
<b>ANEXO IV</b> –Ficha de acompanhamento clínico do SUS	99
<b>ANEXO V</b> -Requisição do exame citopatológico	100
<b>ANEXO VI</b> - Questionário para caracterização do perfil epidemiológico	102
<b>ANEXO VII</b> - Escore de Nugent	104

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O microambiente vaginal é um ecossistema complexo, onde se encontram microrganismos que vivem em ténue equilíbrio. Os microrganismos residentes que compõem a microbiota vaginal são bactérias aeróbias, anaeróbias e fungos do gênero *Candida*, sendo que as bactérias com maior predomínio no ecossistema vaginal são os *Lactobacillus* spp. Estes microrganismos metabolizam o glicogênio presente no epitélio estratificado vaginal produzindo ácido láctico, que mantém o pH ácido, além de produzirem antimicrobianos, inibindo o crescimento de outras espécies e proporcionando proteção ao ecossistema vaginal. Outros microrganismos incluem *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Atopobium vaginal*, *Mycoplasma hominis*, *Peptoestreptococcus* sp., *Prevotella*, dentre outros.

O equilíbrio do ambiente vaginal é dinâmico e pode ser rompido, culminando na proliferação de microrganismos, podendo causar doenças. O ténue equilíbrio pode ser modulado por fatores internos, como as variações hormonais, o sistema imunológico e o estado emocional. Entretanto, fatores externos como o uso de anticoncepcional e a dieta também podem atuar na modificação deste equilíbrio.

Vulvovaginites são doenças que se desenvolvem devido à quebra do equilíbrio do ecossistema vaginal, favorecendo o aumento de microrganismos residentes, ou mesmo através da introdução de um patógeno. Caracteriza-se por prurido, sensação de queimação, dor e eritema. Os principais tipos de vulvovaginite são a candidíase, tricomoníase e a vaginose bacteriana.

A vaginose bacteriana é uma síndrome na qual observa-se o aumento de bactérias anaeróbias em substituição aos *Lactobacillus* spp., causando a elevação do pH vaginal e levando ao aparecimento de um corrimento com odor fétido. Apresenta etiologia polimicrobiana, podendo ser encontradas as bactérias *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e *Atopobium vaginae*.

As vulvovaginites podem ser encontradas também em associação com outros microrganismos, tais como o Papilomavírus humano (HPV). Porém, os processos que permeiam essas associações ainda não estão elucidados.

O Papilomavírus Humano (HPV) é o vírus mais prevalente na população sexualmente ativa no mundo. Através de uma microlesão, o vírus infecta o epitélio cervical, podendo ficar assintomático ou estabelecer uma infecção produtiva. Infecções persistentes por HPV podem levar a transformações celulares, que podem evoluir para lesões intraepiteliais, e que podem assim progredir para o câncer. Dessa forma, o HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer do colo do útero.

O câncer do colo do útero ocupa o sétimo lugar no *ranking* mundial, e entre as mulheres brasileiras é o quarto tipo de câncer mais comum, sendo que a região Sudeste ocupa a quarta posição, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018). O HPV tem sido encontrado em 90% dos casos de câncer, e genótipos de HPV de alto risco oncogênico, principalmente o HPV 16 e HPV 18, tem se mostrado em associação a atipias celulares, principalmente as lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (HSIL). Estudos sugerem uma associação entre microrganismos causadores de vulvovaginites 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 cérvico-vaginais.

Assim, dando sequência a linha de pesquisa “Patógenos associados às doenças cérvico-vaginais em mulheres em idade reprodutiva em Juiz de Fora/MG”, a tipagem molecular do HPV em mulheres com ou sem a presença de atipias celulares cervicais é de grande importância, bem como se há relação entre o HPV e a vaginose bacteriana, já que outros estudos mencionam a possibilidade desta associação atuar como um cofator no determinismo das neoplasias cervicais.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MICROBIOTA VAGINAL

A vagina faz parte do sistema reprodutor feminino. É um órgão que permite a passagem do feto no momento do parto e também atua como via para a menstruação e a cópula. O epitélio vaginal é constituído por várias camadas (basais, parabasais, intermediárias e superficiais), que formam o epitélio estratificado não queratinizado, com características descamativas. A parede vaginal apresenta uma camada mucosa rica em glicogênio. O glicogênio presente na vagina é transformado em glicose pelos microrganismos residentes, e posteriormente fermentado a ácido láctico. Esse proporciona a redução do pH vaginal, deixando-o ácido, o que é fundamental para inibir microrganismos oportunistas e patogênicos (WIRA; RODRIGUEZ-GARCIA; PATEL, 2016).

A microbiota vaginal é um nicho ecológico formado por diversos microrganismos residentes. Esses microrganismos coexistem em um ecossistema equilibrado, no qual as espécies se interagem produzindo uma barreira de defesa para o organismo humano. O equilíbrio desse microambiente depende da interação entre as espécies da microbiota vaginal. Em alguns momentos esse equilíbrio é perdido, ocasionando um processo infeccioso (DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2016). Dessa maneira, a microbiota pode ser utilizada como indicador de saúde, uma vez que alterações na sua composição levam a ascensão de um microrganismo, podendo ocasionar uma doença (GAJER *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2013).

O equilíbrio do microambiente vaginal pode ser modulado por fatores internos, como a resposta do sistema imunológico, imunossupressão, gravidez, estado emocional, variações hormonais ao longo do ciclo menstrual ou variações relacionadas as fases da vida, como a puberdade e a menopausa. Pode ainda sofrer influência de fatores externos, como o uso de antibióticos, uso de anticoncepcional e práticas de higiene pessoal (DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2016).

Ao longo da vida de uma mulher, o ecossistema vaginal sofre variações que são influenciadas por diversos fatores, sendo um deles os níveis de estrogênio. Este hormônio modifica o pH e conseqüentemente modula a composição dos microrganismos. Após o nascimento, a vagina é colonizada por lactobacilos, devido ao seu pH ácido, que se mantém por semanas. Depois, com a redução do estrogênio materno, que é transferido ao recém-nascido durante a amamentação, o pH vaginal é alterado tornando-se neutro, o que permite o surgimento de uma microbiota mista, caracterizada por bacilos e cocos. Na infância, predominam bactérias Gram negativas anaeróbias, como as dos gêneros *Fusobacterium* e *Bacteroides*, além de Gram positivos anaeróbios como *Peptococcus* e *Peptostreptococcus*. Os gêneros *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Prevotella*, bem como leveduras são encontrados em baixa frequência (MITRA *et al.*, 2016).

Quando a produção de estrogênio se inicia na puberdade, esse hormônio promove o espessamento do epitélio e aumento do glicogênio, favorecendo a fermentação dos lactobacilos e redução do pH. A microbiota vaginal na puberdade é semelhante a de mulheres adultas, com prevalência de *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* e *Lactobacillus crispatus*, permanecendo regulada pelos níveis de estrogênio e os fatores internos e externos. Na menopausa, quando a produção deste hormônio é reduzida, a constituição da microbiota sofre alteração, voltando a ser mista (GAJER *et al.*, 2012; PETROVA *et al.*, 2013).

O ambiente vaginal saudável é composto majoritariamente por *Lactobacillus* (95%), em especial *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii* (MASTROMARINO; VITALI; MOSCA, 2013; TUROVSKIY *et al.*, 2011), embora *L. iners* possa ser também encontrado tanto em uma microbiota saudável como em um ambiente vaginal com um processo infeccioso. Os outros 5% compreendem à bactérias como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Atopobium* e fungos do gênero *Candida*. As bactérias e leveduras presentes em menor frequência na microbiota vaginal em condições de disbiose podem se proliferar, causando doenças (CHABAN *et al.*, 2014; CHARBONNEAU *et al.*, 2016).

Através de sequenciamento de 16S RNAr de amostras vaginais nos trabalhos de RAVEL e colaboradores (2011) e MITRA e colaboradores (2015),

foi possível compreender a composição do microbioma vaginal. Análises desse microbioma possibilitaram a realização de uma classificação baseada na espécie dominante de *Lactobacillus* encontrados. Assim, a microbiota vaginal pode ser dividida em cinco grupos microbianos. Os grupos I, II, III e V são aqueles que apresentam prevalência de *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*, respectivamente; enquanto que o grupo IV é constituído por *Lactobacillus* spp., porém com uma maior diversidade de bactérias anaeróbias, o que o associa a doenças. Segundo RAVEL e colaboradores (2011), a microbiota vaginal com predomínio de *L. crispatus* implica em um microambiente mais ácido do que quando outras espécies de lactobacilos dominam, sugerindo que o *L. crispatus* é um dos maiores produtores de ácido láctico, fazendo com que sua prevalência reflita em um efeito protetor maior.

Os *Lactobacillus* são bactérias Gram positivas que apresentam a morfologia de bacilo, também podendo se apresentar como cocobacilos. Essas bactérias são fermentadoras, metabolizam o glicogênio gerando ácido láctico, o que reduz o pH vaginal (3 – 4,5). A acidificação do ambiente vaginal é fundamental para a manutenção da homeostase do ecossistema, uma vez que inibe o crescimento de microrganismos que podem levar a quadros inflamatórios e infecciosos (O'HANLON; MOENCH; CONE, 2013; WITKIN; LINHARES, 2016; BROTMAN *et al.*, 2014).

Os *Lactobacillus* também se aderem às células do epitélio vaginal constituindo um biofilme. Essa aderência é devido a adesinas, que se conectam a receptores específicos celulares, impedindo a colonização do tecido por potenciais patógenos (MARTÍN *et al.*, 2008). Além do biofilme e da produção de ácido láctico, essas bactérias também produzem antimicrobianos, aumentando a proteção do ecossistema vaginal (BROTMAN *et al.*, 2014). Um antimicrobiano importante é o peróxido de hidrogênio. Essa substância 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 que não produzem catalase (MARTÍN *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2014). Os *Lactobacillus* ainda produzem compostos antagonistas conhecidos como bacteriocinas. Estes compostos são proteínas antimicrobianas ou complexos protéicos, usualmente um peptídeo, ativos

contra espécies bacterianas patogênicas e oportunistas, podendo atuar como bactericida ou ter ação inibitória (OJALA *et al.*, 2014).

Os *Lactobacillus* podem ser usados como probióticos, atuando na recolonização do ambiente vaginal. Podem ser úteis no combate a infecções e atuar, ainda, na promoção da saúde, uma vez que podem contribuir com a manutenção da homeostasia (MA *et al.*, 2014; MASTROMARINO; VITALI; MOSCA, 2013). Mastromarino e colaboradores (2013) utilizaram *Lactobacillus* como probióticos, com uma alta concentração de bactérias ( $10^9$  UFC), sendo utilizados *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* e *L. acidophilus*, que foram administrados na forma intravaginal. Os autores demonstraram que esse probiótico conseguiu atuar na recolonização do microambiente vaginal, reduzindo a incidência de infecções recorrentes.

No ecossistema vaginal saudável junto com os lactobacilos ainda são encontradas espécies de *Candida*, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria* spp., *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium* spp., *Peptoestreptococcus* sp., *Prevotella*, *Clostridium*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Ureaplasma urealyticus*, *Listeria* e *Mobiluncus* spp., dentre outras. Estes microrganismos são oportunistas, e em condições de desequilíbrio podem tornar-se prevalentes, causando doenças. Com a redução das espécies de lactobacilos, o microambiente vaginal que era desvantajoso e inóspito para essas espécies, passa a ser profícuo, favorecendo-as (BROTMAN *et al.*, 2011; NARDIS; MOSCA; MASTROMARINO, 2013).

Há mulheres cuja microbiota vaginal normalmente não é dominada por lactobacilos, mas sim por outras bactérias também produtoras de ácido lático, como *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* e *Leptotrichia*; sendo as duas últimas capazes de produzir metabólitos secundários que possuem um odor desagradável (CHABAN *et al.*, 2014; PETROVA *et al.*, 2013).

## 2.2 VULVOVAGINITES

As infecções vaginais são a principal causa de reclamações nos consultórios ginecológicos. Vulvovaginite (VV) é uma afecção que se desenvolve quando ocorre uma disbiose no ambiente vaginal, favorecendo a proliferação de um microrganismo ou pode estar associada com a introdução de um patógeno. A VV caracteriza-se por prurido, sensação de queimação, dor e eritema. Dependendo de sua etiologia, a VV pode ser dividida em candidíase, tricomoníase e vaginose bacteriana (CUNHA *et al.*, 2017)

Tricomoníase é uma infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais comumente transmitida no mundo. Trata-se de uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis*. Estudos sobre a prevalência dessa IST revelaram que nos Estados Unidos a tricomoníase tem prevalência de 2,5% a 26,2%. Estudos na América do Sul demonstraram a ocorrência dessa parasitose de 7,6% na Argentina, 7,8% no Chile, 9,1% no Peru, e no Brasil a porcentagem de doentes varia de 2,6% a 20%. Por tratar-se de uma doença negligenciada, a qual não é notificada pelos programas de saúde, os dados ainda são subestimados (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

A vulvovaginite com maior importância e prevalência é a candidíase, que pode ser definida por 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). As espécies de *Candida* comumente encontradas na vagina são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (ILKIT; GUZEL, 2011; CUNHA *et al.*, 2017;). Em populações susceptíveis, a candidíase pode ser recorrente, principalmente por *Candida glabrata*, com quatro ou mais episódios durante o ano; porém a causa dessa recorrência é desconhecida (NAGASHIMA; YAMAGISHI; MIKAMO, 2016; CUNHA *et al.*, 2017). Alguns fatores predisponentes podem desencadear a proliferação deste fungo, como a gravidez, na qual muitas mulheres apresentam candidíase recorrente. Terapêutica com antimicrobianos, uso de anticoncepcional, diabetes, imunossupressão, são outros fatores que podem promover o desequilíbrio da microbiota vaginal, favorecendo o crescimento de outras espécies presentes no

meio, principalmente de leveduras do gênero *Candida* (WEISSENBACHER *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2017).

As doenças mais comuns que acometem as mulheres em idade reprodutiva são a candidíase e a vaginose bacteriana. Estima-se que uma em cada quatro mulheres adultas saudáveis terão pelo menos um episódio de candidíase durante a vida, e destas, 5 a 8% terão infecção recorrente (FOXMAN *et al.*, 2013). No tratamento da candidíase são administrados localmente imidazoles ou triazóis, como miconazol e fluconazol (MENDLING *et al.*, 2016).

A vaginose bacteriana (VB) é uma síndrome polimicrobiana, caracterizada pela perda do equilíbrio da microbiota vaginal e posterior aumento de bactérias anaeróbias (SRINIVASAN *et al.*, 2015; ONDERDONK; DELANEY; FICHOROVA, 2016). Esta comunidade está representada por espécies de *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp., *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. A proliferação destes microrganismos é acompanhada pela elevação do pH vaginal, uma vez que o número de lactobacilos reduz drasticamente, perdendo o seu caráter protetor (LING *et al.*, 2010; RAVEL, JACQUES *et al.*, 2013; SHIPITSYNA *et al.*, 2013). Ao se proliferarem, muitos microrganismos produzem proteases que degradam o muco, rompendo a barreira química que protege o epitélio vaginal e cervical (MITRA, A *et al.*, 2015). A partir do metabolismo destas bactérias, são produzidas aminas com odor desagradável (MASTROMARINO; VITALI; MOSCA, 2013; MORENA; SANTOS, 2014; MALAGUTI *et al.*, 2015; FAURE *et al.*, 2016). O odor é exacerbado com o aumento do pH, o que ocorre após a ejaculação do homem no canal vaginal e no período menstrual (MOREIRA-MASCARENHAS *et al.*, 2012). Na VB observa-se o aparecimento de um corrimento vaginal com odor fétido, que pode apresentar colorações diversas, podendo ser esbranquiçado, amarelado ou acinzentado. Dependendo do quadro, esta secreção pode ser discreta ou abundante, podendo estar associada a prurido e ardência; entretanto, uma parcela substancial de mulheres afetadas podem ser assintomáticas (RAVEL, JACQUES *et al.*, 2013; ONDERDONK; DELANEY; FICHOROVA, 2016).

A VB demonstrou ser um fator de risco para o desenvolvimento de doença inflamatória pélvica, infertilidade, aumento do risco para doenças sexualmente transmissíveis, como HIV e HPV, e ainda associa-se à ocorrência de parto prematuro e aborto. Possui reflexos sociais e emocionais negativos, pois o odor desagradável pode levar a um constrangimento por parte da paciente. Soma-se a isso a falta de outros sintomas, o que faz com que a mulher não procure atendimento médico, acreditando tratar-se de falta de higiene (ALVES *et al.*, 2014; BARRETO ALVES *et al.*, 2016).

A VB não tem como agente etiológico um único microrganismo, embora observa-se a presença de *Gardnerella vaginalis* na maioria dos casos. Entretanto, também são encontrados com frequência as bactérias *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* sp., *Fusobacterium* sp., *Prevotella* sp. e *Peptostreptococcus* sp. (MALAGUTI *et al.*, 2015; MASTROMARINO; VITALI; MOSCA, 2013). Estudos de sequenciamento do 16S rDNA, realizados por Ling e colaboradores (2010) em mulheres com VB permitiram estruturar a composição da microbiota dessas mulheres. Nelas, foram identificadas bactérias pertencentes aos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Fusobacteria*. De acordo com Petrova e colaboradores (2015), as bactérias comumente relacionadas a VB são *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *E. coli*; podendo ainda ser encontrado também *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* spp., *Leptotrichia* spp., *Clostridium*, *Dialister* spp., *Streptobacillus* spp., *Chloroflexi* spp., *Olsenella* spp., *Porphyromonas asaccharolytica*, *Shuttleworthia* spp. e *Eggerthella hongkongensis*.

Em algumas mulheres, o quadro clínico resolve-se sem intervenção medicamentosa. Quando necessário, os fármacos usados são a ampicilina, penicilina e metronidazol na forma oral ou tópica, porém, uma parcela de mulheres terá VB recorrente. Várias causas têm sido apontadas como fatores predisponentes de VB e de recorrência, tais como o número de parceiros sexuais, o uso antibióticos, uso de DIU, hábitos de higiene íntima e ducha vaginal; porém o fator desencadeante ainda não está elucidado (TUROVSKIY *et al.*, 2011; MENDLING *et al.*, 2016). Embora não seja aceita como uma infecção de transmissão sexual, parece estar intimamente ligada à atividade sexual (PURAN *et al.*, 2014). O uso de contraceptivos hormonais pode

promover uma microbiota predominante de lactobacilos, o que parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento da VB (MOREIRA MASCARENHAS *et al.*, 2012).

### 2.2.1 Diagnóstico de vulvovaginites

O diagnóstico das VV, muitas vezes, se baseia em sinais e sintomas, em especial o corrimento vaginal, e é elaborado quase que exclusivamente por uma anamnese. O padrão-ouro para o diagnóstico de candidíase ainda é o crescimento em cultura da levedura em Agar Sabouraud dextrose (ILKIT; GUZEL, 2011). Para o diagnóstico de VB, são utilizados os critérios de Amsel (AMSEL *et al.*, 1983) e Nugent (NUGENT; KROHN; HILLIER, 1991).

AMSEL e colaboradores (1983) estabeleceram seu diagnóstico com base em quatro critérios relacionados ao corrimento vaginal (aspecto, pH, teste de aminas e *clue cells*). Quanto ao aspecto do corrimento, observa-se sua coloração (branco, amarelado ou acinzentado) e se tem aspecto bolhoso. Com relação ao pH vaginal, verifica-se se está maior que 4,5. O teste de aminas (teste de Whiff) avalia o odor exalado, haja vista que na VB a vagina apresenta um odor desagradável, devido a liberação de aminas voláteis. Por fim, constata-se presença de células guia (*clue cells*), que são células epiteliais vaginais recobertas com bactérias, em exame a fresco ou em esfregaço corado pelo método de Gram. A presença de três destes critérios confirma o diagnóstico clínico de VB (CHAVAN *et al.*, 2013; RAVEL; JACQUES *et al.*, 2013).

O critério desenvolvido por NUGENT e colaboradores (1991), conhecido como Escore de Nugent, é o padrão ouro para a confirmação de VB, uma vez que se trata de um processo que elimina aspectos subjetivos dos critérios de Amsel, como a verificação do odor exalado no teste de aminas e aspecto do corrimento. Desta forma, os critérios propostos por Nugent possuem maior possibilidade de reprodutibilidade e maior confiabilidade. O Escore de Nugent consiste na observação do esfregaço do conteúdo vaginal corado pelo método de Gram, com posterior análise da contagem de morfotipos de *Lactobacillus*, *Gardnerella vaginalis*/*Bacteriodes* sp. e de *Mobiluncus* spp. Os morfotipos são



quantificados de 1 a 4, de acordo com sua ocorrência por campo. Estes números são somados a fim de se obter o escore final e estabelecer o resultado do teste. Assim, o teste pode ter como resultado normal (0-3), intermediário (4-6) e positivo para VB (7-10) (NUGENT; KROHN; HILLIER, 1991).

O Escore de Nugent não permite a distinção dos microrganismos que são residentes da microbiota vaginal e que em condições de disbiose também podem causar a VB, tais como as espécies de *Prevotella*, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* (BROTMAN, 2011).

Uma técnica amplamente utilizada é o Papanicolaou, que é um método prático, de baixo custo, porém tem baixa sensibilidade (43,1%) (PURAN *et al.*, 2014). Importante para a identificação de alterações nas células cervicais, este teste permitiu a redução em 80% dos casos de morte por câncer do colo de útero, uma vez que é empregado de forma rotineira nas consultas ginecológicas (CHAVAN *et al.*, 2013). No entanto, estudos revelam que o Papanicolaou não é um teste robusto para a detecção de VV, uma vez que utiliza *clue cells* como único critério para o diagnóstico da VB e, além disso, a amostra advém do colo do útero e não da vagina (GREENE; KUEHL; ALLEN, 2000).

Mudanças nos tipos e nas proporções relativas das espécies microbianas na vagina podem levar a um estado de desequilíbrio na homeostase, com a proliferação de microrganismos pertencentes ao grupo IV (aumento de anaeróbios com redução de lactobacilos). A candidíase e a vaginose bacteriana podem ser comumente encontradas em associação as ISTs, como a tricomoníase, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus do herpes e o papiloma vírus humano (HPV). Vulvovaginites relacionadas à ocorrência de HPV são frequentes, sendo esta associação um dos co-fatores para o desenvolvimento do câncer cervical (RANDELOVIĆ *et al.*, 2012; VAN DE WIJGERT *et al.*, 2014).

## 2.3 PAPILOMAVÍRUS HUMANO - HPV

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus transmitido sexualmente. Dentre as ISTs, é o vírus com maior prevalência entre a população jovem. Pode ser encontrado em associação com as VV e com outros vírus, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Através de microlesões, infectam o epitélio escamoso da pele e mucosas, podendo causar lesões benignas ou malignas. As lesões benignas são conhecidas como verrugas ou papilomas, e as malignas como neoplasias. O vírus também pode persistir no organismo de forma assintomática (WAGNER *et al.*, 2015; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

O Comitê Internacional de Taxonomia viral – *The International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) – inicialmente classificou o papilomavirus na família *Papovaviridae*, associando-o ao poliomavírus, devido a estrutura genômica dos mesmos, sendo vírus de DNA de fita dupla circular e capsídeo não envelopado. No entanto, análises posteriores constataram diferenças no tamanho e na organização genômica dos vírus. Assim, o ICTV segregou a família *Papovaviridae*. Atualmente, o poliomavirus pertence à família *Polyomaviridae* e o papilomavirus a família *Papillomaviridae*, onde está descrita a espécie *Human papillomavirus* (DOORBAR *et al.*, 2012). Os papilomavirus são agrupados em 16 gêneros, sendo o principal o *Alphapapillomavirus*, que representa 90% dos HPVs. São reconhecidos mais de 200 tipos de HPV, sendo aproximadamente 40 relacionados ao epitélio genital (WOODMAN *et al.*, 2007).

Os HPVs são classificados de acordo com a análise do gene *L1*. Essa região genômica está relacionada com as proteínas que formam o capsídeo viral. O gene *L1* é a região mais conservada do genoma viral. Assim, é utilizado para a identificação e segregação dos genótipos de HPV. Um novo isolado é reconhecido quando o genoma completo for clonado e existir diferenças nas sequências da região de leitura aberta (*Open reading frames* – ORF) maiores que 10% em relação a um papillomavirus de maior proximidade genética conhecido. Os HPVs são classificados em genótipos, subtipos e variantes. Quando a diferença entre os genes *L1* for de 10%, estabelece-se um novo genótipo. Diferenças entre 2% e 10% é classificado como subtipo. Diferenças

menores de 2% determinam uma variante do vírus. Cada genótipo classificado é atribuído a sigla do vírus (HPV) seguido de um número, em sequência dos genótipos existentes (WOODMAN *et al.*, 2007; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

Com base no potencial oncogênico, ou seja, a associação do vírus a lesões precursoras e câncer cervical, os HPVs podem ser agrupados em tipos de alto risco e tipos de baixo risco. Os tipos de baixo risco para a indução de malignidade incluem os HPVs 6, 11, 42, 43 e 44, que promovem alterações celulares, ocasionando a formação de verrugas genitais. Os tipos classificados como de alto risco apresentam um alto potencial de transformação celular, ocasionando alterações celulares precursoras do câncer, e inclui os tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70 e 82. Existe ainda um grupo intermediário, no qual alguns autores classificam como pertencente ao grupo de alto risco, porém, apresentam baixa frequência nas amostras de lesões escamosas intraepiteliais; são os tipos 30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68 e 69 (BURD, 2003; MARIANI; VICI; SULIGOI, 2015; SCHIFFMAN *et al.*, 2016) Dentre os representantes mais prevalentes, o HPV 16 é o tipo viral encontrado com maior frequência, seguido do HPV 18, sendo responsáveis por aproximadamente 70% das infecções. Depois destes, os mais comuns são o 31, 33, 45, 52 e 58 (SERRANO *et al.*, 2012; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

O HPV tem sido considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, que é o terceiro tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres (SERRANO *et al.*, 2012; STEENBERGEN *et al.*, 2014). Contudo, o HPV sozinho não é a causa determinante para a transformação neoplásica. A essa transformação estão associados outros fatores, como tipo viral, coinfeções com outros patógenos, ou com outros tipos de HPV, hormônios, predisposição genética, co-fatores ambientais e socioeconômicos, imunossupressão – como aquela causada pelo vírus HIV – entre outros, que influenciam a formação de uma neoplasia (MOODY; LAIMINS, 2010; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

O genoma do HPV é composto de DNA de fita dupla circular, com aproximadamente 8000 pares de base (pb) inserido em um capsídeo esférico, não envelopado, disposto segundo uma simetria icosaédrica, com diâmetro de

55 nanômetros (nm), composto por 72 capsômeros (DUENSING; MÜNGER, 2002).

O genoma viral (figura 1) pode ser dividido em duas regiões codificantes, compreendendo as sequências de leitura aberta (*Open reading frames* – ORF), conhecidas como precoce ou *Early* (E), relacionada a proteínas não estruturais e região tardia ou *Late* (L), que codifica as proteínas estruturais. Estas denominações estão relacionadas com o momento em que as proteínas são expressas na replicação. Além das regiões codificantes, existe uma região controladora (*Long control region* – LCR) que não possui ORF's, e que controlam os processos de replicação e transcrição viral (MUÑOZ *et al.*, 2006). 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, relacionadas a regulação da expressão gênica viral, transcrição, replicação e a transformação celular (DUENSING; MÜNGER, 2002).

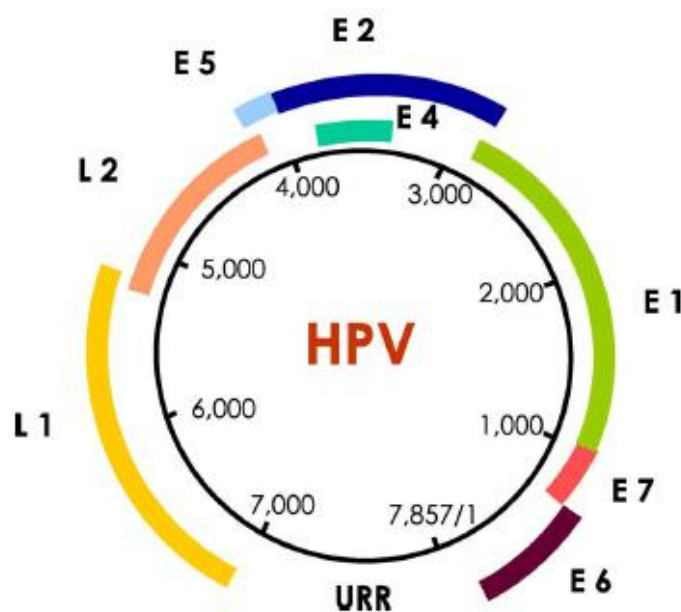


Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV

Fonte: MUÑOZ *et al.*, 2006.

O gene *E1* é o maior e o mais conservado dentre os genes precoces, produz a fosfoproteína E1 que apresenta 70 a 80 KDa, possui atividade de

helicase dependente de adenosina – trifosfato (ATP), se liga a regiões ricas em AT e contém domínios de ligação à proteína E2. A proteína E2 possui 50 KDa e três domínios funcionais que regulam a transcrição e atuam na replicação; pode se ligar ao LCR e reprimir as proteínas E6 e E7. Em células com transformação maligna, a região *E1/E2* se modifica com a integração do vírus no genoma do hospedeiro, e assim a regulação das proteínas E6 e E7 torna-se nula (MUÑOZ *et al.*, 2006). A proteína E4 ainda não tem função definida, mas acredita-se que esteja relacionada a liberação dos vírus da célula, através de modificações citoplasmáticas e perturbações no citoesqueleto celular (WOODMAN *et al.*, 2007).

As proteínas E5, E6 e E7 são consideradas oncogênicas. A função da proteína E5 não está bem estabelecida, mas sabe-se que é altamente hidrofóbica e pequena, com capacidade de aumentar o poder de transformação maligna da proteína E7. 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 (WOODMAN *et al.*, 2007; THOMAS *et al.*, 2008; MOODY; LAIMINS, 2010; STEENBERGEN *et al.*, 2014).

A região tardia do genoma contém os genes *L1* e *L2*, que codificam proteínas que recebem a mesma denominação (*L1* e *L2*). Estas são estruturais, sendo a *L1* a principal e a *L2* a secundária, e o arranjo das mesmas culmina na formação do capsídeo viral. A *L1* medeia a ligação viral na superfície celular. A proteína *L2* promove a encapsidação do genoma viral. As proteínas produzidas pelos genes tardios estão sendo utilizadas na produção de vacinas, uma vez que são imunogênicas e se organizam em partículas semelhantes aos vírus, as chamadas VLPs – *virus like particles* – (SCHILLER; DAVIES, 2004; RODEN; WU, 2006; DILLNER *et al.*, 2010; HORVATH *et al.*, 2010;).

O vírus infecta células da camada basal, e para que isso ocorra deve haver a perda da integridade do tecido, com a formação de microlesões ou traumas. Assim, a medida que as células se dividem, migram em direção a

superfície do tecido e se diferenciam. Ao se dividirem, as células com HPV distribuem os vírus para as células filhas; algumas destas permanecem na camada basal atuando como um reservatório viral (MOODY; LAIMINS, 2010). O vírus se liga a célula hospedeira através da proteína L1, que se associa a receptores conservados na superfície celular, os glicosaminoglicanos de heparan sulfato. A internalização viral ocorre lentamente por endocitose. As vias relatadas neste processo são as mediadas por clatrina e caveolina, que são proteínas que trabalham em cooperação com o citoesqueleto para a deformação das membranas na formação de vesículas (HORVATH *et al.*, 2010).

O papilomavirus pode promover dois tipos de infecção: a latente e a produtiva. A infecção latente é assintomática, na qual o DNA viral é mantido sob a forma epissomal. Já na infecção produtiva ocorre a replicação viral. Em uma infecção produtiva o DNA viral pode se integrar ao genoma humano, levando a transformações neoplásicas. No epitélio pavimentoso estratificado vaginal os dois tipos de infecção podem ocorrer concomitantemente (ZUR HAUSEN, 2009; INCA, 2016). O genoma viral na infecção latente se mantém como um elemento extracromossomal no núcleo, replicando-se juntamente com o DNA da célula hospedeira. As proteínas E1 e E2 atuam neste processo, mantendo o DNA viral na forma epissomal. Condições adversas, como a imunossupressão pode levar a ativação viral, com suspensão da latência, ocasionando infecção produtiva. Na infecção produtiva, o DNA viral é replicado independente do DNA da célula hospedeira. A replicação ocorre nas células em proliferação, com expressão das proteínas precoces (GALLO *et al.*, 2003).

Nas camadas superiores do epitélio pavimentoso estratificado da vagina, verifica-se a expressão de L1 e L2, a fim de realizar a montagem dos vírions. A liberação das partículas virais acontece na superfície do tecido, onde o mesmo se descama, haja vista que o HPV não possui ciclo lítico. A presença dos vírus nestas células provoca anormalidades morfológicas, como as verrugas e coilocitos. Estes são células irregulares com uma zona perinuclear muito ampla (vazia) (DILLNER *et al.*, 2010).

Com a infecção produtiva persistente, podem decorrer distúrbios no controle da replicação viral que levam a quebra da integridade do genoma humano, pois o DNA viral se integra 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, incluindo *E6* e *E7*, causando transformação celular e a formação de um tumor (GALLO *et al.*, 2003; STEENBERGEN *et al.*, 2014). A oncoproteína *E5* não apresenta a capacidade de transformação celular, porém pode acentuar as funções das proteínas *E6* e *E7*, contribuindo para o desenvolvimento de células neoplásicas (ZUR HAUSEN, 2009).

### **2.3.1 Atipias escamosas celulares e sua relação com os tipos de HPV**

Ao longo dos anos, as nomenclaturas citopatológica e histopatológica do colo do útero sofreram mudanças significativas. Inicialmente, o sistema de classificação citológica foi proposto por George Papanicolaou, em 1943. Este estabeleceu cinco classes – I, II, III, IV, V – que representavam, respectivamente, ausência de células atípicas ou anormais, presença de células atípicas sem evidência de malignidade, sugestivo de malignidade, muito suspeito de malignidade e maligno. Posteriormente, foi introduzido o termo displasia, que designa atipia epitelial cervical intermediária entre o normal e o carcinoma *in situ* (CIS), podendo ser leve, moderado ou severo (VALIYA; BAXI, 2015).

Em 1968, foi introduzido o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de grau I, II e III (leve, moderado e severo). O Sistema de Bethesda foi adotado em 1988. No ano de 2001, a classificação foi alterada com a proposta de unificar as terminologias e incorporar novos conceitos (VERMA, 2014).

O sistema de Bethesda propôs que o termo lesão intraepitelial escamosa (*squamous intraepithelial lesions* – SIL) fosse adotado para denominar as lesões observadas. As SIL foram divididas em: 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 (VERMA, 2014). Ainda, segundo os Critérios de Bethesda, as atipias celulares

são classificadas como 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 HPV tem a capacidade de induzir lesões do colo do útero, LSIL ou HSIL. As LSIL podem ser transitórias ou podem evoluir para HSIL e progredir para o câncer invasivo, sendo os HPVs de alto risco (16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) aqueles que apresentam o maior potencial de integração ao genoma humano, responsáveis por aproximadamente 90% dos cânceres cervicais, conforme a tabela 1 (DE SANJOSÉ *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013; WAGNER *et al.*, 2015). De acordo com SCHIFFMAN e colaboradores (2016), o HPV 16 está presente em 60% dos casos de câncer cervical; enquanto que o HPV 18 é positivo em 15% destes casos. KHANDKER e colaboradores (2016) e KJÆR e colaboradores (2014) observaram que amostras de lesões de baixo grau obtiveram diagnóstico positivo para HPV em mais de 50% dos casos; com relação a HSIL, todas as amostras foram positivas para HPV; nas lesões do tipo ASC-US a positividade de HPV também foi alta (72,3%). XU e colaboradores (2015) observaram que os HPVs de maior prevalência em LSIL foram os HPV 16 (40,4%), HPV 51 (23,8%), HPV 52 (19,1%) e HPV 58 (14,3%). O HPV 16 também foi encontrado em HSIL como o de maior predomínio (55,5%), seguido de HPV 58 (20,4%), HPV 33 (8,5%) e HPV 52 (8,2%). Segundo SERRANO e colaboradores (2014), a positividade de HPV aumentou gradativamente com o grau da doença, com presença do mesmo em 68,8% das amostras de LSIL e 78,9% em amostras de HSIL. Com relação aos tipos, o HPV 16, seguido do HPV 18 foram os mais prevalentes, tanto em LSIL quanto em HSIL. No Brasil, a prevalência de HPV 16 e HPV 18 foi de 69,7%, seguido de HPV 45 (6,9%), HPV 33 (5,2%), HPV 31 (3,1%), HPV 52 (2,5%) e HPV 58 (1,1%) (SERRANO *et al.*, 2014).



Tabela 1: Principais tipos de HPV presentes nas lesões cervicais.

<b>Lesões cervicais</b>	<b>Tipos de HPV</b>
LSIL	6, 11, 16, 18, 31, 39, 42, 43, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82
ASC-US	6, 11, 16, 18, 31, 39, 40, 42, 44, 51, 56, 58, 66
ASC-H	16, 31, 51, 52, 58
HSIL	11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58, 59, 70, 82
Câncer Invasivo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 82

Fonte: (KONDO *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2016; MUÑOZ *et al.*, 2006).

Infecções múltiplas por HPV são frequentes, principalmente entre mulheres jovens sexualmente ativas. Coinfecções com vários tipos de HPV podem estar relacionadas ao aumento da severidade das lesões cervicais, estando presente em casos de HSIL e câncer. No entanto, o consenso sobre esta associação ainda não está bem estabelecido (SALAZAR *et al.*, 2015; SOHRABI *et al.*, 2017). CHATURVEDI e colaboradores (2011) pesquisaram a relação entre coinfecção e risco de desenvolvimento do câncer em mulheres da Costa Rica. Os autores observaram que 18,2% das mulheres possuíam coinfecção por HPV. Estas apresentavam lesões de alto grau, mostrando a associação de coinfecções com a progressão das lesões cervicais. FIGUEIREDO ALVES e colaboradores (2013), no Brasil, estimaram a prevalência de coinfecções por HPV em adolescentes. Foi observada uma frequência de 44,6% de mulheres com coinfecção. Os tipos virais envolvidos foram o HPV 6, 16, 18, 31, 33, 39, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 66 e 73. O estudo sugere a correlação entre a alta prevalência de múltiplos tipos de HPV com o aumento dos níveis de estrogênio durante a puberdade, que aumentam a susceptibilidade biológica ao vírus. O estudo ainda associa coinfecções com um maior risco de desenvolvimento e progressão das lesões. Estudos de DEMAZOIN e colaboradores (2013) a respeito da distribuição dos tipos de HPV na França detectaram alta prevalência de coinfecções por HPV (40%). DICKSON e colaboradores (2013) observaram uma frequência de 4,6% de coinfecções causada por HPV nos Estados Unidos. Destas 3,9% eram de infecções por dois tipos virais, 0,6% das infecções eram por três tipos virais e 0,1% eram de quatro tipos, sendo os prevalentes o HPV 16, 18, 31, 33, 35, 52,

58 e 67. As mulheres infectadas com dois ou mais tipos virais tiveram um risco aumentado em suas lesões cervicais, com progressão das mesmas.

As lesões cervicais podem vir acompanhadas de alterações no ecossistema vaginal, como as VV. O HPV pode ser encontrado associado a outros vírus, como o HIV, ou a outros microrganismos, como o *Trichomonas vaginalis* e à vaginose bacteriana, que possui etiologia polimicrobiana (GAO *et al.*, 2013).

## 2.4 MICROBIOTA VAGINAL E SUA RELAÇÃO COM O HPV

A microbiota vaginal tem um papel importante na manutenção da saúde deste ecossistema. A disbiose nesse ecossistema promove o aumento de bactérias relacionadas a comunidade IV, resultando em VB (BROTMAN *et al.*, 2014).

Estudos sugerem que a ocorrência de VB pode estar relacionada com a infecção por HPV, aumentando a susceptibilidade do organismo ao vírus; porém os processos envolvidos ainda não foram elucidados (GAO *et al.*, 2013). Segundo SHANNON *et al.*, (2017) a incidência de HIV aumenta em 60% nos casos em que a microbiota vaginal se encontra em desequilíbrio (VB), sugerindo que o mesmo pode ocorrer com relação ao HPV. A infecção por HPV pode também estar associada com o vírus HIV, existindo um risco duas vezes maior que o normal para contaminação, quando já existe um dos vírus no organismo.

Alguns estudos tentaram descrever a estrutura da comunidade microbiana de pacientes com HPV, a fim de se encontrar uma associação entre bactérias e o vírus. Alguns autores afirmam que as bactérias que podem estar associadas a uma infecção por HPV são a *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus gasseri* (GAO *et al.*, 2013); *Snethia*, *Megasphaera*, *Prevotella* e *L. iners* (LEE *et al.*, 2013); *Snethia*, *Peptostreptococcus* e *Anaerococcus* (MITRA *et al.*, 2015).

## 2.5 TÉCNICAS PARA ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA

A análise citológica pelo método de Papanicolaou é a base para o rastreamento de infecção pelo HPV, assim como para a detecção precoce de câncer. Porém, este método apresenta limitações, assim como os métodos dependentes de cultivo, uma vez que muitas espécies bacterianas residentes não podem ser cultivadas, fazendo com que grande parte da microbiota vaginal seja desconhecida, principalmente com relação a VB. Diante disso, os métodos em questão devem ser usados em casos de triagem, para detectar alterações sugestivas da infecção viral (ZUNA *et al.*, 2007; BOBEK *et al.*, 2010).

Os métodos independentes de cultivo se mostraram eficazes para o estudo dos microrganismos que compõem o ecossistema vaginal. Através de métodos moleculares de *fingerprinting* e estudo do gene DNAr 16S, que é uma região altamente conservada, é possível identificar a composição microbiana, o que contribui para o aprimoramento das análises que complementam o conhecimento desse microambiente. Entre as técnicas de biologia molecular que tem sido aplicadas para avaliação da presença de microrganismos, destaca-se a técnica da Reação em cadeia da polimerase – PCR. Este método de biologia molecular também permite a detecção do HPV e a genotipagem viral (FREDRICKS, 2011; MARTÍN *et al.*, 2014).

A Reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica mais sensível para o diagnóstico e genotipagem do HPV, sendo altamente específica. Baseia-se na amplificação de sequências específicas do DNA, pela enzima DNA-polimerase. Da reação se obtém bilhões de cópias da sequência alvo, que podem ser visualizadas após a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (MARTINS *et al.*, 2016). Na detecção e genotipagem do HPV são utilizados várias combinações de iniciadores para a amplificação de sequências específicas do DNA de diferentes regiões do genoma; possibilitando a sua detecção, inclusive em infecções não produtivas, além dos tipos virais envolvidos (YAMAGUCHI *et al.*, 2002; FU *et al.*, 2015; CUSCHIERI *et al.*, 2016)

A técnica de PCR-DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante) tem sido empregada na identificação da diversidade microbiana.

Sustenta-se na separação de fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas de sequências diferentes. A separação ocorre devido a mobilidade eletroforética do DNA parcialmente dissociado em gel de poliacrilamida, contendo gradiente desnaturante linear composto por ureia e formamida. A sequência de nucleotídeos de um fragmento de *amplicons* definirá a posição no gradiente em que o DNA de fita dupla irá desnaturar-se passando a fita simples, interrompendo sua migração no gel. Moléculas de DNA diferentes migrarão de maneiras diferentes. Por tratar-se de uma técnica rápida e eficiente, a mesma é amplamente aplicada como um método de *fingerprinting* genético para analisar o perfil da comunidade microbiana. Entretanto, o DGGE apresenta algumas limitações. A técnica não permite a identificação de espécies. O método permite a separação de apenas fragmentos pequenos, limitando a quantidade de informações que inferem a composição da microbiota vaginal. A identificação dos membros da comunidade microbiana pode ser dada pelo sequenciamento das bandas excisadas (ALIOUA *et al.*, 2016; CRUCIANI *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2013).

Outro método de biologia molecular que pode ser aplicado para o estudo de comunidades microbianas é o sequenciamento do 16S rDNA, que possibilita determinar a sequência de bases do DNA que compõe o genoma. Conhecer 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. O sequenciamento de DNA baseado no método de Sanger sustenta-se na terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos. Foi descrito por Sanger em 1977 e continua sendo utilizado, apesar de suas desvantagens, como a necessidade de uso de bibliotecas de clones para a preparação das amostras em alguns casos, processo este caro e demorado, e a baixa velocidade de produção alcançada com esse tipo de tecnologia, a qual é, em muitas ordens de magnitude, inferior àquela desejável em projetos de genômica. Com o intuito de aprimorar as deficiências mencionadas, surgiu o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), que apresenta maior rapidez. As tecnologias NGS são capazes de gerar dados na ordem de milhões a bilhões de pares de bases por experimento (ou corrida), contra as relativamente poucas milhares de bases

proporcionadas pelo método de Sanger automatizado (FREDRICKS, 2011; MARDIS, 2011; PAREEK *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2014).

Desta forma, a avaliação da diversidade microbiana do ecossistema vaginal, bem como a detecção da presença do Papilomavirus humano em amostras de secreção vaginal de mulheres com atipias celulares cervicais, contribuirá para a geração de conhecimento a respeito das alterações que ocorrem 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 cérvico-vaginais (MA *et al.*, 2014)

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a influência da microbiota vaginal na incidência de lesões intraepiteliais cervicais a partir de fluido vaginal de mulheres com e sem atipias celulares cervicais, e relacionar com a presença do papilomavirus humano, atendidas no serviço de ginecologia de Juiz de Fora (MG).

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar características sócio-demográficas e aspectos clínicos de pacientes atendidas no serviço de ginecologia de Juiz de Fora, com exame citológico preventivo (Papanicolaou) normal e sugestivo da presença de atipias celulares cervicais;
- Determinar a ocorrência concomitante de vaginose bacteriana nas amostras de fluido vaginal das mulheres com e sem atipias celulares, considerando-se como parâmetro diagnóstico o Escore de Nugent;

- Diagnosticar e determinar o genótipo do vírus HPV nas amostras de raspado cervical colhidas das pacientes;
- Avaliar a estrutura da comunidade bacteriana nas amostras de fluido vaginal dessas pacientes, pela técnica de PCR-DGGE;
- Correlacionar a presença do HPV com o Escore de Nugent, o Papanicolaou e a diversidade bacteriana observada nas pacientes.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 População amostrada**

Este é um estudo transversal e prospectivo, onde a população estudada é do sexo feminino, com idades variando entre 18 e 72 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 março de 2017. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob o parecer número 1.297.680 (Anexo I).

Foram considerados como critérios de inclusão das pacientes no estudo: terem realizado o exame citológico preventivo de Papanicolaou, com resultado indicativo da presença de atipias celulares cervicais (atipias de significado indeterminado em células escamosas, conforme classificação do SUS e da Subsecretaria de Atenção Primária à Saúde, para encaminhamento ao serviço de colposcopia – Anexo II), 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 IIIA e IIIB). 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, V e VI).

Considerando-se os riscos envolvendo pesquisa com seres humanos, de acordo com o preconizado pela legislação vigente, o estudo em questão é 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 colposcopia da Prefeitura Municipal de Juiz de Fora foi obtido, após resultado de exame citológico preventivo (Papanicolaou) indicativo da presença de atipias celulares, 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 Bacteriana do 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 Exame microscópico direto dos espécimes clínicos**

Das amostras de fluido vaginal coletadas, foi preparado um esfregaço em lâmina, que posteriormente foi submetido à coloração de Gram para visualização de células bacterianas supra citoplasmáticas (*clue cells*) e células descamativas da mucosa, para determinação do escore de Nugent (Anexo VII).

### **4.4 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).

### **4.5 Determinação dos genótipos virais do HPV**

O DNA de todas as amostras foi submetido à amplificação do gene da  $\beta$ -globina, que é utilizado para avaliar a qualidade do DNA extraído. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação foram o PC05 e PC03 (10 pMol/ $\mu$ L), descritos na tabela 2 (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995). As reações foram feitas com volume final de 25  $\mu$ L, composta por 1  $\mu$ L de cada iniciador (10 pMol/ $\mu$ L), 9,5  $\mu$ L de água, 12,5  $\mu$ L de Gotaq Green Master Mix (PROMEGA,



WI –USA), que compreende Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> e tampões, e 1 µL do DNA molde (20ng/ µL).

A reação de PCR para a β-globina foi realizada sob a seguinte condição: temperatura inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos para a desnaturação, 45°C por 30 segundos para o anelamento e 72°C para extensão, e a extensão final de 72°C por 10 minutos.

Tabela 2: Iniciadores utilizados na avaliação do DNA extraído.

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento	Gene alvo
PC03 PC05	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC GAA ACC CAA GAG TCT TCT CCT	195	β Globina humana

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. Como controle negativo foram, reações de amplificação sem o DNA molde; como controle positivo, foi utilizado DNA extraído de células HeLa e SIHA (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995).

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

A fim de detectar os genótipos de HPV, foi utilizado um par de iniciadores relacionados as regiões E6 e E7 do genoma viral, capazes de amplificar a maioria dos HPVs de alto risco, como os tipos 16, 18, 31, 33, 52, 56 e 58. Estes podem apresentar tamanhos de fragmentos amplificados que variam de 306 a 343 pb. As sequências dos iniciadores são: E6CF4 (5' ATT CTG TGT ATG GAG AAA CAT TAG AA 3') e E7CR3 (5' TGA GCT GTC GCT TAA TTG CTC 3') (YAMAGUCHI *et al.*, 2002).

A reação teve como volume final 25 µL, utilizando 12,5 µL de Gotaq Green Master Mix (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.*, 2002).

#### 4.5.2 Genotipagem do HPV

A genotipagem do HPV foi realizada por reações independentes para cada tipo viral, sendo pesquisados neste trabalho o HPV 16, 18, 31, 33, 52 e 58. Para a genotipagem dos HPVs 16, 18, 31 e 52 foi aplicada a técnica de *Hemi-Nested-PCR*. Esta variação da PCR tem como finalidade 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 usado anteriormente e o outro iniciador, dependendo do tipo viral, interno à região consenso amplificada. Os iniciadores utilizados no *Hemi-Nested-PCR* estão descritos na tabela 3 (YAMAGUCHI *et al.*, 2002).

Tabela 3: 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
31SF1	5' GTA TGG AAC AAC ATT AGA AAA ATT GAC 3'	HPV 31	249	e6/e7
52SF2	5' CTA TTA GAT GTA TGA TTT GTC AAA CG 3'	HPV 52	300	e6/e7

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

Para o HPV 58 foi realizado PCR tradicional utilizando os iniciadores E7CR3 e 58SF1 (5' ATG TAA AGT GTG CTT ACG ATT GC 3'), que amplificam um fragmento de DNA com tamanho de 375 pb (YAMAGUCHI *et al.*, 2002).

As reações de *Hemi-Nested-PCR* e PCR tradicional tiveram volume final de 25 µL. Assim, foram usados 12,5 µL de Gotaq Green Master Mix (PROMEGA, WI -USA), 9,5 µL de água, 1 µL de cada oligoiniciador (10 pMol/µL) e 1 µL do produto da primeira reação (E6CF4/E7CF3). A PCR foi realizada sob as seguintes condições propostas por YAMAGUCHI e colaboradores (2002), com temperaturas de anelamento para o HPV 16 de 54°C, HPV 18 de 52°C, e os outros tipos de HPV com temperatura de anelamento de 48°C.

Na genotipagem do HPV 33 foi empregado os iniciadores 33F (5' ATG ATA GAT GAT GTA ACG CC 3') e 33R (5' GCA CAC TCC ATG CGT ATC AG 3'), segundo GRCE e colaboradores (1997), com tamanho do fragmento de 455 pb (gene alvo nas regiões *e1/e2* do genoma viral). Nesta amplificação, foi utilizada a técnica de PCR *Touchdown*, que visa evitar a amplificação de sequências inespecíficas, aumentando a especificidade em temperaturas elevadas e aumentando assim a eficiência ao reduzir gradativamente a temperatura de anelamento. Os primeiros passos de um ciclo de PCR *Touchdown* tem altas temperaturas de anelamento, e esta é reduzida em cada conjunto subsequente de ciclos (GRCE *et al.*, 1997).

A reação de PCR *Touchdown* foi realizada da mesma forma e com as mesmas concentrações das reações de genotipagem dos outros tipos de HPV. Entretanto, as condições do PCR foram as seguintes: temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 4 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos para anelamento, 72°C por 60 segundos para a extensão, seguido de mais 34 ciclos com 94°C por 30 segundos, anelamento em 55°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 60 segundos. Os ciclos de amplificações foram seguidos de uma extensão final de 72°C por 15 minutos.

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, foram realizadas reações de PCR para três amostras usando os iniciadores específicos para HPV dos tipos 16, 18 e 31. 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 de genotipagem.

#### **4.6 Análise da estrutura da diversidade bacteriana na microbiota vaginal**

##### **4.6.1 Amplificação de DNAr 16S de representantes do domínio Bacteria**

A análise da diversidade bacteriana foi realizada pela técnica de PCR-DGGE. Inicialmente, foi realizada a PCR para amplificação do DNAr 16S de representantes do Domínio Bacteria. Os oligonucleotídeos utilizados nesta reação foram F984GC (5'-GC.- AACGCGAAGAACCTTAC-3') (GC = sequência rica em G+C) (HEUER et al., 1997) e R1378 (5'-ACGGGCGGTGTGTACA -3') (BLACKWOOD et al., 2005) para amplificação da região V6 do DNA correspondente ao RNA 16s bacteriano. A reação de PCR continha aproximadamente 20 ng/μL de DNA total, 0,5 μL de cada primer (10 μM), 12,5 μL de Gotaq Green Master Mix (PROMEGA, WI, USA) e 10,5 μL de água.

As condições da PCR foram: temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 20 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 53°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 2 minutos para a extensão. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Foi utilizado o branco. 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.

#### 4.6.2 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

Para a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) foram aplicados 20 µL dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida (acrilamida:*N,N'*-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE (tris-acetato-EDTA) 1X. O gradiente desnaturante variou linearmente de 45% a 65%, utilizando-se como agentes desnaturantes, uréia, 7M, e formamida desionizada 40% v/v. O gradiente foi formado através de duas soluções estoque de 0% (solução acrilamida/bisacrilamida 20% v/v, TAE 50X 2% v/v, água q.s.p) e 100% (solução acrilamida/bisacrilamida 20% v/v, TAE 50X 2% v/v, uréia 7M, e formamida desionizada 40% v/v) e dispensadas pelo formador de gradiente (Modelo 475 *Gradient Delivery System* – BIO-Rad Califórnia, USA). Ainda, foram adicionados 0,03% (p/v) de persulfato de amônio (polimerizador), 0,17% (v/v) de TEMED (*N,N,N',N'*- tetrametiletileno diamino) (catalisador) e 50µL de corante (azul de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% e TAE 1X para visualização do gradiente.

A eletroforese foi realizada em temperatura e voltagem constantes (60°C e 50V), durante 16 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBER® *Gold* (Invitrogen™), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel visualizada no transluminador ultravioleta *ImageQuant* 100 (*GE Healthcare*) e capturada com o auxílio da câmera ED LENS SP-500 UZ (Olympus).

O DGGE foi conduzido no equipamento DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad – California, USA).

#### **4.7 Análise estatística**

Para a análise dos dados epidemiológicos foi realizada uma Correlação univariada através dos Testes de Fisher e Odds Ratio. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as comparações e as tabelas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad *Software*, San Diego, Califórnia, USA).

A comparação estatística dos perfis de bandas dos géis de PCR-DGGE foi realizada utilizando o programa Bionumerics 7.1. A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente Jaccard de similaridade e no método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) para análise dos agrupamentos.

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Características sócio-demográficas e aspectos clínicos de pacientes atendidas no serviço de ginecologia público e particular do Município de Juiz de Fora**

No presente estudo foram coletadas amostras cervicais de 74 mulheres, sendo divididas em 41 mulheres que apresentaram exame Papanicolaou alterado, com resultado de presença de atipias celulares, assim como amostras cervicais de 33 mulheres com resultado de exame de Papanicolaou normal, sendo consideradas mulheres clinicamente saudáveis. A média etária das participantes foi de 30,21 para mulheres sem lesão e 36,64 para mulheres com lesão, com faixa etária variando de 18 a 72 anos. A caracterização dos grupos segundo características sócio-demográficas encontra-se na tabela 4, onde de maneira geral destaca-se que 48,49% das participantes sem lesão e 43,91% de mulheres com lesão apresentam-se na faixa etária de 18 a 30 anos. Com relação ao grupo sem lesão, observa-se que 54,55% são solteiras, 57,58% são brancas e 45,46% apresentam ensino médio completo, e neste grupo foi relatado o maior índice de mulheres com ensino superior (33,33%). No grupo

com lesão verifica-se que 41,46% classificou o *status* de relacionamento como outros, sendo a mesma percentagem referente a solteiras, 36,58% são brancas e 43,91% possuem ensino médio.

As características clínicas e comportamentais, relatadas pelas pacientes, estão apresentadas na tabela 5. De maneira geral, nos dois grupos, a maioria das mulheres apresentou vida sexual ativa, assim como o número de parceiros acima de um, não são tabagistas, nem fazem uso de drogas ou álcool.

Tabela 4. Características sócio-demográficas das mulheres participantes do estudo

Variáveis analisadas	Frequência de observação	
	Sem lesão (n = 33)	Com lesão (n = 41)
Idade		
18 – 30	16 (48,49%)	18 (43,91%)
31 – 40	10 (30,30%)	9 (21,95%)
41 - 50	3 (9,09%)	7 (17,07%)
> 51	4 (12,12%)	7 (17,07%)
Estado civil		
Solteira	18 (54,55%)	17 (41,46%)
Casada	11 (33,33%)	7 (17,08%)
Outros	4 (12,12%)	17 (41,46%)
Etnia		
Branca	19 (57,58%)	15 (36,58%)
Parda	6 (18,18%)	13 (31,71%)
Negra	8 (24,24%)	13 (31,71%)
Escolaridade		
Analfabeto	0 (0%)	1 (2,44%)
Ensino fundamental incompleto	4 (12,12%)	10 (24,39%)
Ensino fundamental	0 (0%)	6 (14,63%)
Ensino médio incompleto	1 (3,03%)	4 (9,75%)

Ensino médio	15 (45,46%)	18 (43,91%)
Ensino superior incompleto	2 (6,06%)	1 (2,44%)
Ensino superior	11 (33,33%)	1 (2,44%)

Tabela 5. Características clínicas e comportamentais das mulheres participantes do estudo.

Variáveis analisadas	Frequência de observação	
	Sem lesão (n = 33)	Com lesão (n = 41)
Vida sexual ativa		
Sim	29 (87,88%)	38 (92,68%)
Não	4 (12,12%)	3 (7,32%)
Número de parceiros sexuais		
1 parceiro	5 (15,15%)	7 (17,07%)
≥ 2 parceiros	28 (84,85%)	34 (82,93%)
Tabagista		
Sim	4 (12,12%)	7 (17,07%)
Não	29 (87,88%)	34 (82,93%)
Etilista		
Sim	0 (0%)	3 (7,32%)
Não	33 (100%)	38 (92,68%)
Uso de drogas		
Sim	0 (0%)	1 (2,44%)
Não	33 (100%)	40 (97,56%)
Diabético		
Sim	0 (0%)	3 (7,32%)
Não	33 (100%)	38 (92,68%)
Vulvovaginite		
Sim	0 (0%)	8 (19,51%)
Não	33 (100%)	33 (80,49%)
Aspecto do muco cervical		
Fluido	0 (0%)	24 (58,54%)
Grumoso	0 (0%)	15 (36,58%)
Ignorado	0 (0%)	2 (4,88%)
Coloração do muco cervical		
Branco	0 (0%)	28 (69,28%)
Amarelado	0 (0%)	10 (24,39%)
Ignorado	0 (0%)	1 (2,44%)
Esverdeado	0 (0%)	2 (4,88%)



A tabela 6 apresenta uma análise univariada com relação as variáveis comportamentais e clínicas, através do teste exato de Fisher e Odds Ratio, na qual podemos observar os valores de  $p$ . Houve diferença estatística significativa com relação a ocorrência de vulvovaginite no teste exato de Fisher. A análise de Odds Ratio mostrou correlação positiva entre a prática de vida sexual ativa, assim como a correlação positiva com o aumento do número de parceiros sexuais ao longo da vida da mulher, a prática do tabagismo e o uso de anticoncepcional com relação a ocorrência de lesões cervicais.

Tabela 6: Análise univariada da associação entre variáveis comportamentais e clínicas de mulheres sem e com lesão cervical.

Variáveis analisadas	Grupos de indivíduos		Valor de p*	OR (95% IC)	Valor de p**
	Sem lesão (n = 33)	Com lesão (n = 41)			
Vida sexual					
Sim	29 (87,88%)	38 (92,68%)	0,3781	1,7471 (0,3624 – 8,4235)	0,7624
Não	4 (12,12%)	3 (7,32%)			
Número de parceiros sexuais					
1	5 (15,15%)	7 (17,07%)	0,5405	1,1529 (0,3297 – 4,0319)	0,9249
> 1	28 (84,85%)	34 (82,93%)			
Tabagista					
Sim	4 (12,12%)	7 (17,07%)	0,3987	1,4926 (0,3969 – 5,6136)	0,7898
Não	29 (87,88%)	34 (82,93%)			
Uso de drogas					
Sim	0 (0%)	1 (2,44%)	0,5541	*	*
Não	33 (100%)	40 (97,56%)			
Etilista					
Sim	0 (0%)	3 (7,32%)	0,1644	*	*
Não	33 (100%)	38 (92,68%)			

Vulvovaginite						
	Sim	0 (0%)	8 (19,51%)		*	*
	Não	33 (100%)	33 (80,49%)	0,0063		
Uso de anticoncepcional						
	Sim	19 (57,58%)	26 (63,42%)		1,2772	0,7857
	Não	14 (42,42%)	15 (36,58%)	0,3923	(0,4997 – 3,2641)	
Diabético						
	Sim	0 (0%)	3 (7,32%)			
	Não	33 (100%)	38 (92,68%)	0,1644	*	*

---

\*- Não foi realizado estatística por apresentar zero

p\* - Teste exato de Fisher

OR - Odds Ratio, IC – intervalo de confiança

p\*\* - Odds Ratio

Pela avaliação dos resultados dos exames preventivos (Papanicolaou) das pacientes com lesões cervicais, pode-se observar 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.

Como relatado, de forma geral, as participantes na faixa etária entre 18 e 30 anos foram as mais amostradas neste estudo. Entre estas mulheres, o tipo de lesão mais frequente foi a LSIL (72%). Entre as participantes na faixa etária de 31 a 40 anos, lesão do tipo HSIL foi a mais observada (55%), enquanto que na faixa etária de 41 a 50 anos, menos amostrada, apresentou prevalência de lesão do tipo ASC-US (31%). Entre as pacientes com mais de 51 anos de idade, as lesões de LSIL e HSIL foram encontradas na mesma proporção, com exceção de ASC-US (18%), com predominância de ASC-H, 33% (Figura 02). A análise de Odds Ratio desses dados revelou correlação positiva entre a faixa etária de 18 a 30 anos e LSIL (OR: 5,333 – IC: 1,156-24,61); assim como a mesma faixa etária e ASC-US (OR: 1,803 – IC: 0,4775-6,808).

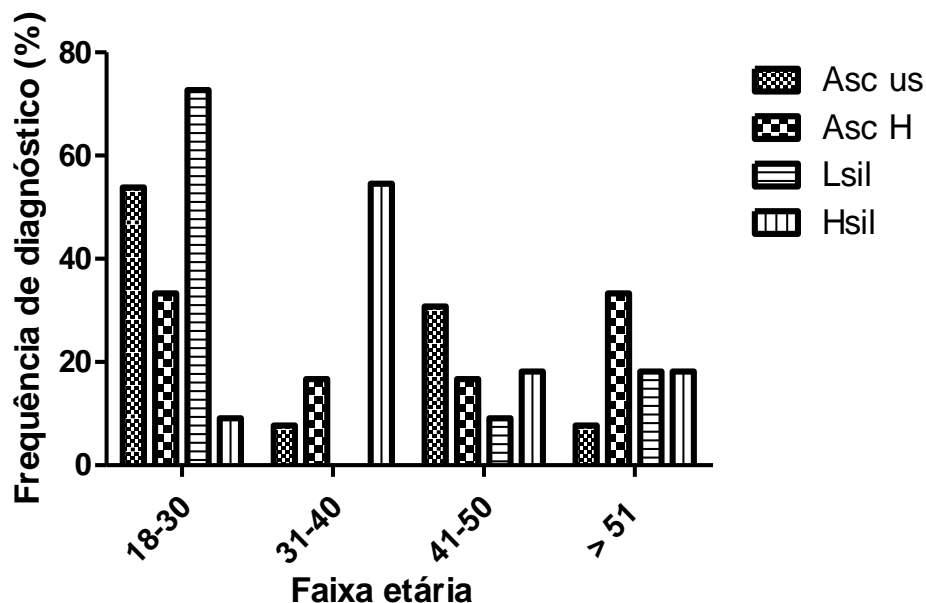


Figura 02: Distribuição das participantes do estudo por idade e frequência de observação dos diferentes tipos de lesão de células escamosas por faixa etária.

## 5.2 Avaliação da ocorrência concomitante de vaginose bacteriana (VB) com a presença das lesões nas amostras de fluido vaginal, considerando-se como parâmetro diagnóstico o Escore de Nugent.

O resultado do Escore de Nugent (Apêndice I) mostrou que 51,22% das mulheres com atipias celulares avaliadas neste estudo puderam ser classificadas como normal (sem a ocorrência de VB), considerando-se o critério diagnóstico para vaginose bacteriana, enquanto que 29,27% foram classificadas com VB. Ainda, 17,07% foram classificadas em escore intermediário. Com relação as mulheres sem lesão, 72,73% foram classificadas com escore normal, 24,24% apresentaram VB e nenhuma paciente teve como classificação o escore intermediário (0%). Nos dois grupos, 1 amostra de cada (sem lesão: 3,03% e com lesão: 2,44%) não foi possível ser analisada, devido à falta de material na lâmina advindo de erro de coleta e/ou fixação.

A associação entre os resultados obtidos no Papanicolaou das mulheres participantes do estudo com o Escore de Nugent, critério diagnóstico para Vaginose Bacteriana (Tabela 7), mostrou que 72,73% das amostras de LSIL foram classificadas de acordo com o Nugent como normal, 50% das amostras de ASC-H foram classificadas como Intermediário e 36,37% das amostras de HSIL apresentaram VB.

Na correlação entre os tipos de lesões cervicais e o escore de Nugent (Tabela 7), observa-se correlação positiva entre ASC-H e classificação intermediário e uma menor correlação, mas ainda sim positiva entre ASC-H e VB. A lesão do tipo LSIL apresentou correlação positiva com o escore normal. Com relação ao HSIL, esse tipo de lesão apresentou correlação positiva com escore de VB e uma correlação positiva maior com escore intermediário.

A avaliação da correlação entre a ocorrência de VB e a presença e ausência de lesões cervicais, incluindo seus grupos separadamente, foi determinada pela razão de Odds Ratio e o teste de Fisher (Tabela 8). Foi observado correlação positiva entre as variáveis do grupo com lesão e sem lesão (OR = 1,286), destacando-se a atipia de classificação de HSIL (OR = 1,714) e de ASC-H (OR = 1,5), que apresentaram maior correlação com a VB. Não foi observada correlação entre a atipia ASC-US e a ocorrência de VB (OR = 1). Entretanto, LSIL apresentou uma menor correlação com a VB (OR = 1,125) em relação aos outros tipos de atipias celulares cervicais em estudo.

O teste de Fisher mostrou que nenhum dos parâmetros avaliados apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

Tabela 7. Associação entre atipias celulares e o Escore de Nugent.

Lesão Intraepitelial	Interpretação do Escore de Nugent (%)		
	Normal (OR - IC 95%)	Escore Intermediário (OR - IC 95%)	Vaginose Bacteriana (OR - IC 95%)
ASC-US <sup>a</sup> (n= 13)	53,85 (0.8596) (0.2364-3.126)	15,38 (0.92) (0.1520-5.568)	23,08 (0.737) (0.1525-3.246)
ASC-H <sup>b</sup> (n=6)	16,67 (0.1900) (0.02028-1780)	50 (8000) (1.186-53.96)	33,33 (1.600) (0.2309-11.09)
LSIL <sup>c</sup> (n=11)	72,73 (3.282) (0.7209-14.94)	0*	27,27 (0.8333) (0.1781-3.899)
HSIL <sup>d</sup> (n = 11)	45,45 (0.6771) (0.1679-2.731)	18,18 (1.920) (0.2865-12.87)	36,37 (1.500) (0.3434-6.551)

<sup>a</sup> ASC-H: Células Escamosas Atípicas que não Excluem Lesões Intraepiteliais de Alto Grau;

<sup>b</sup> ASC-US: Células Escamosas Atípicas com Significado Indeterminado;

<sup>c</sup> LSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de baixo Grau;

<sup>d</sup> HSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau

\*Não é possível fazer análise

Tabela 8: Análise univariada da associação entre a ocorrência de VB e a presença e ausência de atipias celulares.

Variáveis analisadas	Grupos de indivíduos		Valor de p*	OR (95% IC)
	Sem lesão	Com lesão		
	(n = 32)	(n = 40)		
Vaginose Bacteriana				
Sim	8	12	0.7922	1.286 (0.4509 - 3.6666)
Não	24	28		
	<b>Sem lesão</b>	<b>ASC US</b>		
Vaginose Bacteriana				
Sim	8	3	1	1 (0.2160 - 4.630)
Não	24	9		
	<b>Sem lesão</b>	<b>ASC H</b>		
Vaginose Bacteriana				
Sim	8	2	1.4	1.5 (0.2296 - 9.801)
Não	24	4		
	<b>Sem lesão</b>	<b>LSIL</b>		
Vaginose Bacteriana				
Sim	8	3	1	1.125 (0.2388 - 5.300)
Não	24	8		
	<b>Sem lesão</b>	<b>HSIL</b>		
Vaginose Bacteriana				
Sim	8	4	0.467	1.714 (0.3956 - 7.429)
Não	24	7		

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

Com relação as mulheres com lesões cervicais foi detectado o vírus HPV em 97,56%; já com relação ao grupo controle (sem lesão), o vírus do HPV foi encontrado em 84,85% das amostras.

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. Analisando os grupos separadamente, no grupo com lesão, a frequência dos tipos virais observados foram: 87,80% para HPV 16, HPV 18 (68,29%), HPV 31 (2,44%), HPV 52 e 58 (4,88%); sem lesão a prevalência foi de: HPV 16 (81,82%), HPV 18 (69,70%), HPV 52 e 58 (3,03%).

Entre as participantes do estudo, foi observada infecção por apenas um genótipo viral em 16 mulheres (21,62%), sendo 6 mulheres pertencentes ao grupo sem lesão (18,18%) e 10 mulheres do grupo com lesão (24,39%), dados indicados na figura 03. Coinfecção foram observados em 29 participantes com lesão (70,73%) e 22 do grupo sem atipia (66,67%), sendo que nos grupos com e sem lesão, respectivamente, em 58,54% e 60,61% dos casos foi observada coinfecção por HPV 16 e 18. Com relação ao grupo com atipias, 4,88% apresentaram coinfecção por HPV 16 e 58 e HPV 16 e 52; e 2,44% apresentaram coinfecção por três tipos virais (HPVs 16, 18 e 31). Entretanto, no grupo de mulheres sem atipias foi encontrado 2 participantes com três tipos virais: uma com HPVs 16, 18 e 52 e outra com HPVs 16, 18 e 58 (3,03%) – Figura 4.

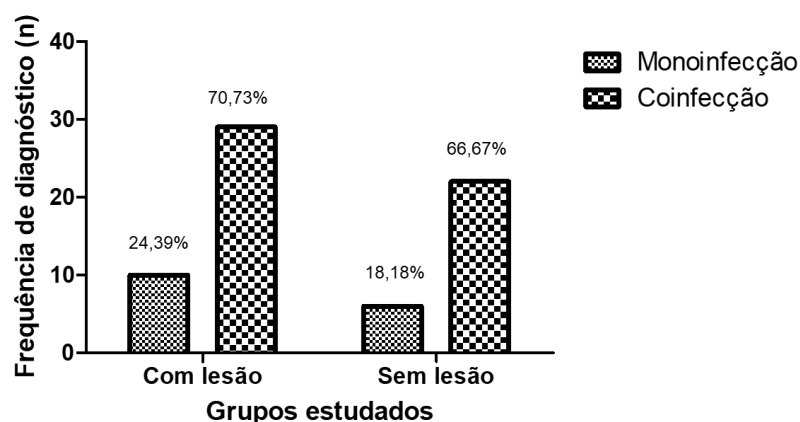


Figura 03. Frequência de diagnóstico (n) de monoinfecção e coinfecção.

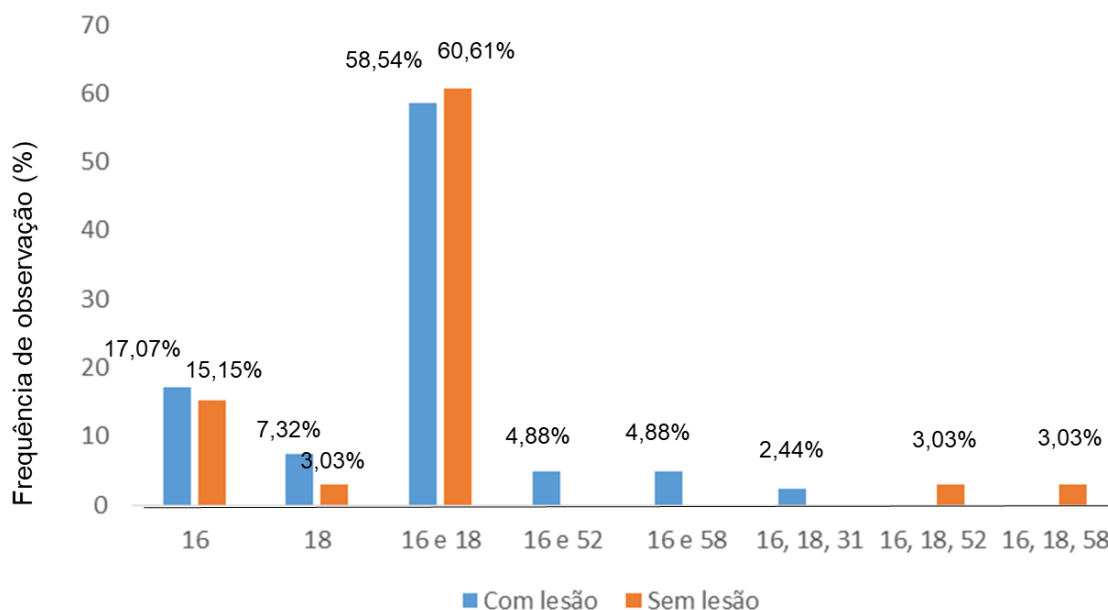


Figura 04. Frequência de diagnóstico (%) dos genótipos encontrados.

Com relação à idade das mulheres que apresentaram HPV positivo, observa-se que na faixa etária entre 18 e 30 anos, foram detectadas as maiores frequências de monoinfecção por HPV 16 (43,75%) e com relação ao HPV 18, a frequência encontrada foi a mesma nas faixas etárias de 18 a 30 e 41 a 50 anos (12,5%). Entre estas pacientes também foi observada alta frequência com relação a coinfeções, sendo observado 18 mulheres com HPV 16 e 18 (35,29%) e duas mulheres (3,92%) com HPV 16 e 58 e uma com três tipos virais, HPVs 16, 18 e 52 (1,96%). Entre as mulheres com faixa etária igual ou maior que 51 anos foi observado, ainda, uma paciente com coinfeção por HPV 16 e 52 (1,96%) e duas mulheres com três tipos de HPV, sendo uma com HPVs 16, 18 e 31 e outra com os tipos 16, 18 e 58 (1,96%) - tabela 9.

Tabela 9: Distribuição dos tipos de HPV de acordo com a faixa etária das mulheres com atipias celulares.

Tipo de infecção	Genótipos virais	Faixa etária (anos), frequência de observação (n;%)			
		18-30 (n=31)	31-40 (n=16)	41-50 (n=9)	≥ 51 (n=12)
Monoinfecção (n=16)	HPV 16	7 (43.75%)	2 (12.5%)	2 (12.5%)	1 (6.25%)
	HPV 18	2 (12.5%)	0	2 (12.5%)	0
Coinfecção (n=51)	HPV 16 / HPV 18	18 (35.29%)	13 (25.49%)	5 (9.80%)	8 (15.69%)
	HPV 16 / HPV 52	0	1 (1.96%)	0	1 (1.96%)
	HPV 16 / HPV 58	2 (3.92%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	HPV 16/HPV 18/HPV 31	0	0	0	1 (1.96%)
	HPV 16/HPV 18/HPV 52	1 (1.96%)	0	0	0
	HPV 16 / HPV 18 / HPV 58	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.96%)
Não detectado (n = 1)		1 (1.96%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

A distribuição dos tipos de HPV detectados nos espécimes clínicos em relação aos diferentes graus de atipia celular das pacientes, mostrou que em monoinfecção, o genótipo HPV 16 foi encontrado em 40% das pacientes diagnosticadas com lesões do tipo ASC-US, 20% em ASC-H e 10% das pacientes com LSIL. O genótipo HPV 18 foi observado em 20% das participantes com lesão do tipo HSIL e 10% LSIL. Com relação às coinfeções, a prevalência de HPV 16 e 18 foi de 27,59% em ASC-US, 24,14% em LSIL, 17,24% em HSIL e 13,79% em ASC-H. A associação HPV 16 e HPV 52 foi encontrada em 2 pacientes (6,90%) com HSIL. Uma paciente com HSIL apresentou coinfeção por 3 tipos virais (16,18 e 31) - tabela 10.

Tabela 10: Distribuição dos genótipos de HPV nos tipos de lesão do colo do útero das mulheres com atipias celulares.

Tipo de infecção	Genótipos virais	Tipos de lesão intraepitelial			
		ASC-US <sup>a</sup>	ASC-H <sup>b</sup>	LSIL <sup>c</sup>	HSIL <sup>d</sup>
Monoinfecção (n=10)	HPV 16	4 (40,0%)	2 (20,0%)	1 (10,0%)	0 (0,0%)
	HPV 18	0 (0%)	0 (0%)	1 (10,0%)	2 (20,0%)
	HPV 16 / HPV 18	8 (27,59%)	4 (13,79%)	7 (24,14%)	5 (17,24%)
Coinfecção (n=29)	HPV 16 / HPV 52	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (6,90%)
	HPV 16 / HPV 58	1 (3,45%)	0 (0%)	1 (3,45%)	0 (0%)
	HPV 16 / HPV 18 / HPV 31	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,45%)
Não detectado (n=1)		0 (0%)	0 (0%)	1 (2,5%)	0 (0%)

<sup>a</sup> ASC-H: Células Escamosas Atípicas que não Excluem Lesões Intraepiteliais de Alto Grau;

<sup>b</sup> ASC-US: Células Escamosas Atípicas com Significado Indeterminado;

<sup>c</sup> LSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de baixo Grau;

<sup>d</sup> HSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau

De maneira geral, da frequência de amostras HPV positivas (Figura 5), pode-se verificar que 81,82% das mulheres referentes ao grupo sem lesão apresentaram DNA do HPV 16, 69,70% apresentaram HPV 18 e uma pequena parcela deste grupo (3,03%) apresentou HPV 52 e 58, na mesma proporção. Do grupo de mulheres com lesão, destaca-se que na lesão do tipo ASC-US, 61,11% das mulheres foram diagnosticadas com a presença de HPV 16, e 33,33% com a presença do HPV 18. Com relação as amostras de mulheres com lesão ASC-H, 60% apresentaram HPV 16 e 40% o HPV 18. Nas lesões de LSIL, as proporções de ocorrência dos tipos virais 16 e 18 foram as mesmas nestas mulheres (45%). Proporções equivalentes também foram encontradas

nas amostras de HSIL, sendo 45% relacionadas ao tipo viral 16 e 40% ao tipo 18. Nas lesões de HSIL foram encontrados genótipos 31 (5%) e 52 (10%).

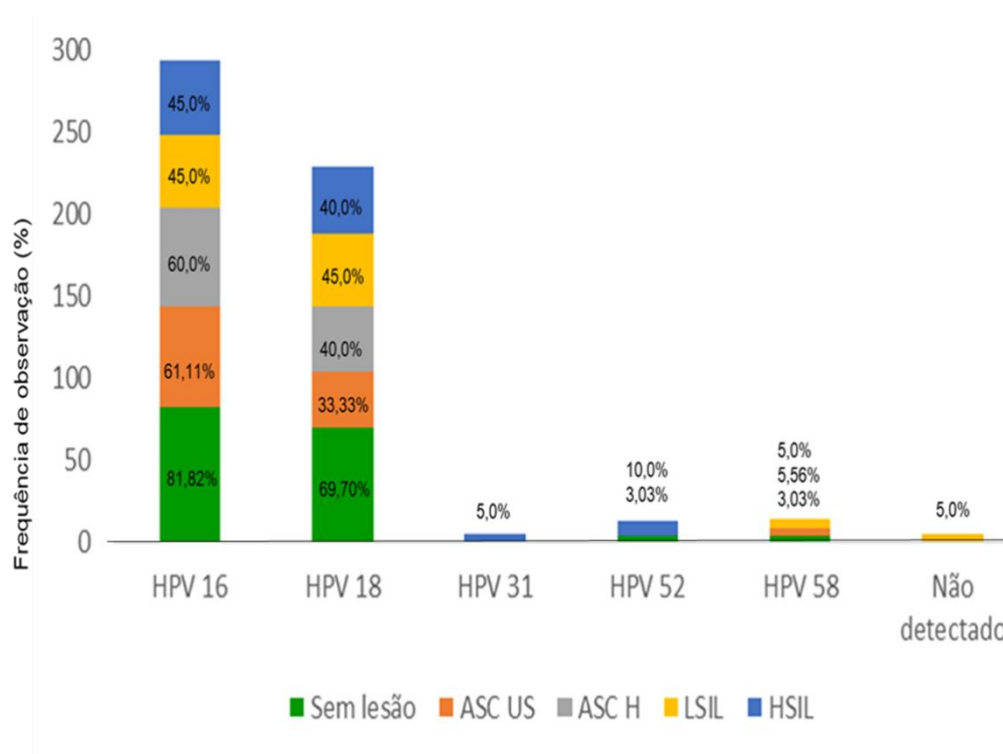


Figura 5: Frequência de observação (%) de amostras HPV positivas distribuídas de acordo com seus tipos virais e tipo não detectado.

Ao avaliar-se a genotipagem viral e o escore de Nugent das mulheres participantes do estudo, observa-se maior frequência de mulheres com escore normal e com genótipo viral de monoinfecção por HPV 16 (43,75%) ou HPV 18 (18,75%). Com relação a coinfeção por 2 tipos de HPV (16 e 18; 16 e 52 e 16 e 58), observa-se maior frequência entre as mulheres saudáveis, assim como na coinfeção por HPVs 16, 18 e 52. Coinfeção por HPVs 16, 18 e 31, foi classificada com escore intermediário e a coinfeção por HPVs 16, 18 e 58 foi relatado a ocorrência de VB (tabela 11).

Analisando os grupos separadamente, no grupo de mulheres com lesão, verifica-se que das mulheres com monoinfecção por HPV 16, 30% apresentaram VB, 20% o escore normal e 10% o escore intermediário. Com

relação a monoinfecção por HPV 18: 20% foram normais e 10% com VB. Das mulheres com coinfecção por HPV 16 e 18, 40% apresentaram escore normal, 23,33% apresentaram VB e 16,66% escore intermediário. Coinfecção por HPV (16 e 58) e (16 e 52) foi encontrada apenas no escore normal (6,66%). Uma mulher apresentou 3 tipos virais (16, 18 e 31) com escore intermediário (3,33%). Neste grupo foi encontrada uma mulher HPV negativo, porém com VB.

No grupo de mulheres sem lesão com monoinfecção por HPV 16, observou-se que 66,66% eram normais e 16,66% com VB; monoinfecção por HPV 18 mostrou que a única mulher com esse tipo viral teve classificação normal. Com relação as coinfecções, HPV 16 e 18, 59,09% das mulheres apresentaram escore normal e 27,27% VB; HPVs 16, 18 e 58 foi encontrado em uma mulher com VB (4,55%); os tipos 16, 18 e 52 foram diagnosticados em uma mulher com escore normal (4,55%). Neste grupo, as mulheres HPV negativas (5) tiveram escore normal.

Tabela 11: Distribuição dos tipos de HPV de acordo com a interpretação do Escore de Nugent das mulheres com e sem atipias celulares.

Tipo de infecção	Genótipos virais	Interpretação do Escore de Nugent (n, %)		
		Normal	Escore Intermediário	Vaginose Bacteriana
Monoinfecção (n=16)	HPV 16	7 (43,75%)	1(6,25%)	4 (25,0%)
	HPV 18	3 (18,75%)	0	1 (6,25%)
	HPV 16 / HPV 18	25 (49,02%)	5 (9,80%)	13 (25,49%)
Coinfecção (n=51)	HPV 16 / HPV 52	2 (3,92%)	0	0
	HPV 16 / HPV 58	2 (3,92%)	0	0
	HPV 16 / HPV 18 / HPV 31	0	1 (6,25%)	0
	HPV 16/ HPV 18/ HPV 52	1 (6,25%)	0	0
	HPV 16/ HPV 18/ HPV 58	0	0	1 (6,25%)
Não detectado (n=1)		1(6,25%)	0	0

#### **5.4 Avaliação da estrutura da comunidade bacteriana nas amostras de fluido vaginal das mulheres participantes do estudo**

Para avaliação da estrutura da comunidade bacteriana nas amostras de fluido vaginal das participantes deste estudo foi utilizado a abordagem do PCR-DGGE. O agrupamento UPGMA a partir dos perfis de bandejamento em eletroforese de acrilamida gerou um dendrograma de similaridade (Figura 6), onde observou-se, com algumas exceções, que os perfis de mulheres com as mesmas características em relação ao escore de Nugent (normais, intermediário e com vaginose bacteriana) tenderam a se agrupar. Destaca-se também alto número de mulheres com microbiota vaginal apresentando 100% de similaridade. Com relação aos tipos de lesões, o dendrograma apresentou vários *clusters*, sem um agrupamento entre os grupos.



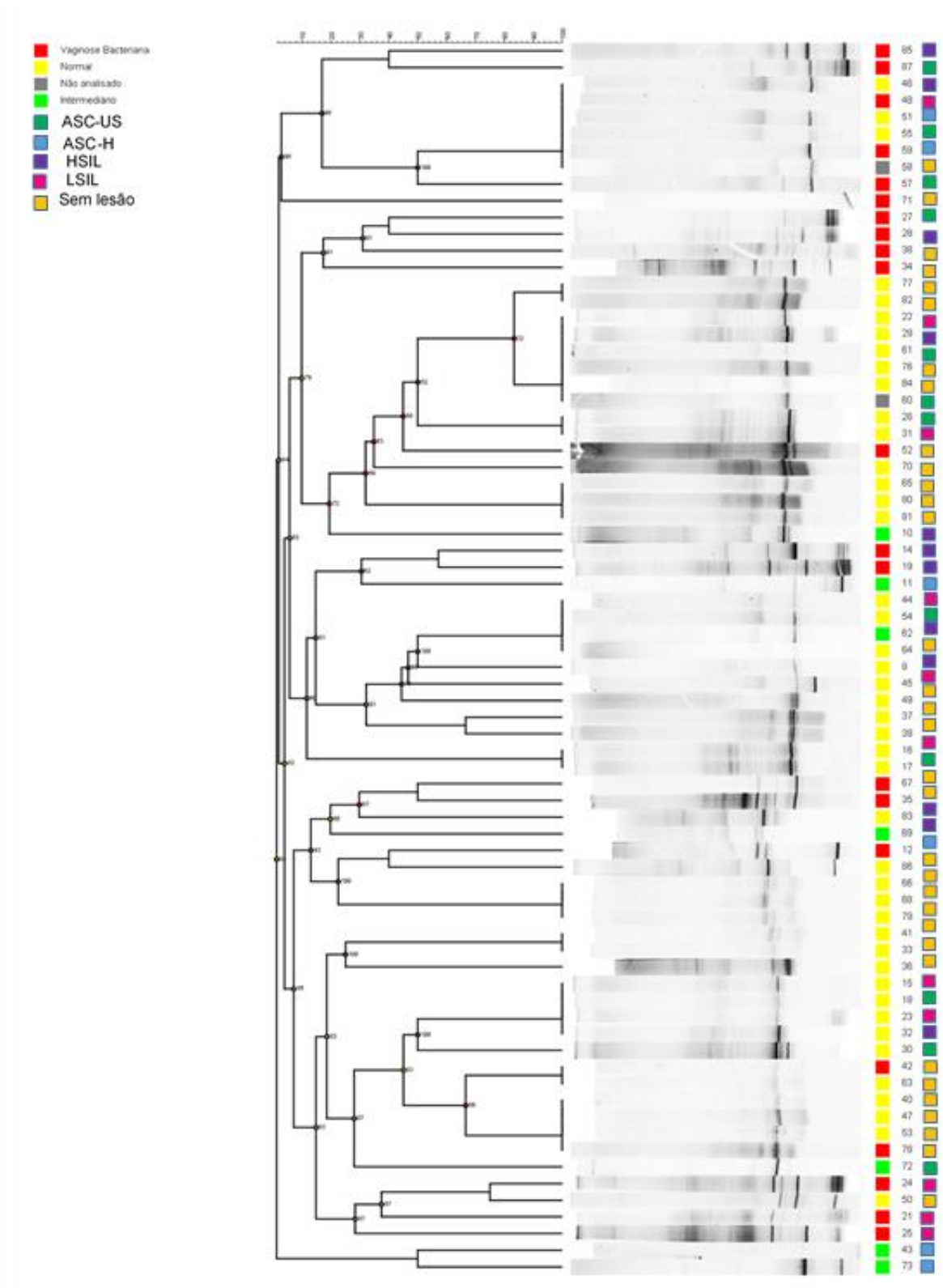


Figura 6. Matriz de similaridade resultante da análise de agrupamento UPGMA com coeficiente de Jaccard, do *fingerprint* dos produtos de amplificação do DNA bacteriano, separados em DGGE, correspondente à região V6 do gene codificador para o RNA16s a partir do metagenoma vaginal das mulheres com e sem atipias celulares cervicais.

## 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* em sua microbiota vaginal, e essas bactérias produzem ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, impedindo a proliferação de potenciais patógenos. Em menor abundância, são encontradas bactérias como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Atopobium vaginae*, dentre outras, e fungos do gênero *Candida* (DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2016). Entretanto, a composição da microbiota pode sofrer alterações, devido a fatores como alimentação, stress, uso de anticoncepcional, hormônios, entre outros, podendo assim ocasionar doenças, em especial a vaginose bacteriana (OJALA *et al.*, 2014).

A vaginose bacteriana (VB) é uma síndrome polimicrobiana decorrente da depleção de *Lactobacillus* e proliferação de outras bactérias como a *G. vaginalis*. A literatura tem demonstrado que uma microbiota alterada pode estar associada com o aumento de infecções sexualmente transmissíveis (IST), incluindo a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) (BARRETO ALVES *et al.*, 2016).

A presença do papilomavírus humano (HPV) no microambiente vaginal é um dos co-fatores para o desenvolvimento de atipias celulares cervicais, que podem progredir para o câncer cervical. O carcinoma escamoso da cérvix uterina é uma doença complexa e resultante de múltiplos determinantes genéticos, biológicos, comportamentais e sócio-econômicos (DILLNER *et al.*, 2010). Portanto, estes determinantes, associados à persistência da infecção pelo HPV, contribuem para o surgimento de alterações celulares cervicais, sendo mais comuns em áreas que apresentam maior desigualdade social, econômica e educacional. No Brasil, o câncer de colo do útero representa o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres brasileiras, segundo o Instituto Nacional do Câncer. O HPV é encontrado em 90% dos casos de câncer, resultando em um problema de saúde pública (INCA, 2018).

O presente estudo caracterizou a estrutura da comunidade bacteriana vaginal de mulheres com e sem atipias celulares cervicais, assim como a

presença e genotipagem do HPV. Foram avaliadas 74 mulheres, divididas em dois grupos: mulheres com resultado de Papanicolaou alterado, com a presença de atipias celulares cervicais (n = 41) e mulheres com resultado de preventivo normal, sem lesões (n = 33). Essas mulheres foram recrutadas no Sistema Único de Saúde e da rede particular do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, onde a maioria reside, porém algumas vivem em cidades vizinhas.

A partir de dados relatados pelas participantes do estudo, foi possível traçar um perfil das mulheres dos dois grupos, nos quais observou-se a prevalência de mulheres compreendidas na faixa etária de 18 a 30 anos, brancas, com ensino médio completo, solteiras; no grupo com lesão verificou-se que a ocorrência de mulheres solteiras e que classificaram seu *status* de relacionamento como outros na mesma proporção. Com relação às variáveis clínicas e comportamentais, a maioria das mulheres possuíam vida sexual ativa e ao longo dos anos tiveram mais de um parceiro sexual, e não são tabagistas.

De acordo com a análise univariada utilizando o teste de Odds Ratio, foi possível verificar associação entre a presença de vida sexual, maior número de parceiros sexuais, prática de tabagismo e o uso de anticoncepcional com a ocorrência de lesões cervicais, portanto, permitindo o reconhecimento da vulnerabilidade.

O termo vulnerabilidade é comumente empregado para designar a susceptibilidade das pessoas às doenças, especialmente doenças infecciosas, como a infecção por HPV (BERTOLOZZI *et al.*, 2009; YASUKO *et al.*, 2011; CASSAMASSIMO DUARTE, 2012). Embora este conceito englobe a ideia de risco, a vulnerabilidade é mais abrangente. O risco envolve a probabilidade de um indivíduo adoecer e morrer. Já a vulnerabilidade envolve aspectos individuais e coletivos que aumentam a susceptibilidade a uma doença, compreende indicadores de iniquidade e desigualdade social, ou seja, trata-se de um conceito multidisciplinar. A vulnerabilidade abrange condições cognitivas, como o acesso à educação, informação; condições comportamentais (fumantes) e sociais (moradia, salário). Conhecer a vulnerabilidade é fundamental para a promoção de saúde, a fim de implementar políticas de saúde e monitoramento, procurando otimizar o

tratamento de doenças através de um diagnóstico precoce, o que no caso de câncer do colo do útero é de extrema importância (SEVALHO, 2017).

GININDZA e colaboradores (2017), ao pesquisar a prevalência e a associação dos fatores de risco para HPV de alto risco em mulheres sexualmente ativas na África, obtiveram como resultado maior frequência de mulheres na faixa etária de 25 a 29 anos, com idade média de 32,2 anos. Além disso, 57,9% das participantes apresentaram o ensino médio completo e 84,2% faziam uso de anticoncepcional, o que corrobora com o presente estudo. Em uma análise univariada, encontraram associação positiva com relação ao número de parceiros sexuais, mostrando que mulheres que tiveram dois parceiros ao longo da vida, possuem risco maior (OR 2,1) de uma infecção por HPV.

KANG e colaboradores (2014), analisando dados epidemiológicos coletados de participantes na zona rural da China, estimaram as tendências da idade na infecção por HPVs de alto risco, e demonstraram que a idade média das participantes com infecção foi de 44 – 44,5 anos, ao contrário do presente estudo. Porém, 99,6% das participantes relataram que não eram fumantes e 91,5% relataram não fazer uso de álcool, de forma semelhante aos resultados obtidos no presente estudo.

Levando-se em consideração o resultado do exame de Papanicolaou alterado, com presença de atipias celulares cervicais, as participantes desse estudo se encontram na faixa etária de 18 a 72 anos, com média de idade de 36,6 anos. Este dado está em conformidade com as Diretrizes Brasileiras do Ministério da Saúde (INCA, 2016), na qual estabelece a faixa etária de 25 a 64 anos com maior potencial de ocorrência de lesões cervicais e câncer do colo do útero. PINHO-FRANÇA; CHEIN e THULER (2016) buscaram mensurar o papel do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) no padrão de anormalidades citológicas cervicais, encontrando predominância de lesões na faixa etária estabelecida para a triagem de câncer cervical, relatada pelo governo Brasileiro, com média de idade de 36,8 anos. Além disso, verificaram a ocorrência do avanço da idade em concordância com o aumento da severidade das lesões. As Diretrizes adotadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) também corroboram com o presente estudo em relação a faixa etária de 18 a 30 anos, na qual houve predominância de LSIL (44,44%). Segundo o INCA, as

mulheres com menos de 24 anos tem baixa incidência de câncer, mas podendo apresentar LSIL, a qual tem grande probabilidade de regressão.

A vaginose bacteriana é uma das principais infecções vaginais em mulheres em idade fértil. No presente estudo, foi encontrada a prevalência de 29,27% de mulheres com lesão e VB e no caso de mulheres sem lesão, 24,24% apresentaram VB. Estima-se que 20 a 30% das mulheres que apresentam secreção vaginal possuem VB. A presença de VB nas amostras incluídas nesse estudo foi superior ao relatado por KENYON; COLEBUNDERS; e CRUCITTI (2013), que pesquisaram dados epidemiológicos de VB em vários países e verificaram a prevalência de VB no Brasil, encontrando uma variação de 15,3% a 21,6% de mulheres com essa síndrome. Os autores encontraram alta prevalência de VB na Jamaica (49%), Peru (40%) e Equador (31%). BAUTISTA e colaboradores (2016) relataram em seu estudo a frequência de VB em alguns países do mundo, e encontraram taxas altas em países africanos, como em Moçambique (68%), Quênia (44%) e Gâmbia (37%). Por outro lado, em países como Noruega e Turquia as taxas foram mais baixas, de 24% e 23%, respectivamente. Essa diferença provavelmente é devido a heterogeneidade etária, a localização geográfica, e a situação sócio econômica e cultural entre as populações investigadas.

O presente trabalho mostrou associação positiva e estatisticamente significativa entre VB e a ocorrência de atipias celulares cervicais, em especial as lesões do tipo ASC-H e HSIL. ZATTONI e colaboradores (2013) encontraram resultado semelhante, no qual demonstraram maior incidência de mulheres com VB associadas a lesões cervicais. GUO e colaboradores (2012) avaliaram a persistência e depuração da infecção HPV de acordo com a presença de vaginose bacteriana e sugeriram que a vaginose bacteriana pode criar um ambiente propício para a persistência da infecção pelo HPV. ZHANG e colaboradores (2017) encontraram relação positiva entre VB e atipias celulares, investigando a relação entre as infecções no trato genital e as lesões cervicais. Os resultados demonstraram que a VB atua como um cofator no desenvolvimento das atipias celulares cervicais, provocando processos inflamatórios e microabrasões no epitélio e promovendo assim a persistência da infecção.

DI PAOLA e colaboradores (2017), ao caracterizarem a microbiota vaginal de mulheres com infecção persistente por HPV, encontraram associação positiva entre a microbiota e o desenvolvimento de lesões cervicais, assim como o presente estudo. Os resultados mostraram que o aumento da diversidade bacteriana concomitantemente com a depleção de *Lactobacillus*, característica da VB, está associado com o desenvolvimento de atipias celulares cervicais, principalmente em mulheres HPV positivas.

Os trabalhos de DI PAOLA e colaboradores (2017) e SODHANI e colaboradores (2017) permitiram elaborar hipóteses para que a associação entre VB e infecção por HPV seja um cofator no determinismo de atipias celulares cervicais e câncer. Uma das hipóteses envolve a elevação do pH vaginal durante uma VB, que favorece e prolonga o período de vulnerabilidade da zona de transformação ocasionada pelo HPV. Outra hipótese está relacionada as aminas voláteis liberadas pelas bactérias anaeróbias, que podem formar nitrosaminas, que são compostos produzidos a partir de nitrito e aminas, e são cancerígenos. Além disso, ocorre uma alteração de citocinas, com o recrutamento de linfócitos T helper 17, citocinas e marcadores pró-inflamatórios, que favorecem a persistência da infecção por HPV e o desenvolvimento de atipias celulares. DI PAOLA e colaboradores (2017) relataram ainda que a bactéria *Atopobium vaginae*, presente em algumas mulheres, pode romper a barreira epitelial, favorecendo a infecção por vírus.

De acordo com ONDERDONK; DELANEY; e FICHOROVA (2016), a VB apresenta uma distribuição epidemiológica semelhante as ISTs. Uma vez que os agentes causais da vaginose bacteriana encontram-se presentes em grande parte da população feminina sem provocar sintomas, há divergências se a VB é uma IST ou não. Entretanto, a VB é uma síndrome que apresenta frequência elevada devido ao aumento de parceiros sexuais. Com base nisso, pode-se inferir que, se a aquisição de HPV e de vaginose bacteriana está sujeita aos mesmos fatores de risco associados ao sexo, a distribuição destas duas condições será, em tese, semelhante em termos de prevalência.

A genotipagem mostrou alta prevalência de HPV positivo nos grupos estudados (97,56% das mulheres com lesão e 84,85% das mulheres sem lesão). Os genótipos encontrados são de alto risco oncogênico, HPVs 16, 18, 31, 52 e 58; dentre os quais o de maior prevalência foi o HPV 16, seguido do

HPV 18. DE OLIVEIRA e colaboradores (2017), ao pesquisarem o raspado cervical de mulheres brasileiras com e sem lesões, encontraram prevalência do HPV 16 nos dois grupos, seguido do HPV 58. Relataram também que os seis tipos virais de maior frequência na América do Sul forma o HPV 16, 18, 31, 45, 33 e 58, sendo o HPV 58 o terceiro mais frequente na população brasileira, dados que são similares ao presente estudo. No mundo, estima-se que 80% das mulheres sexualmente ativas entrarão em contato com pelo menos um tipo de HPV em algum momento da vida (INCA, 2018), frequência essa que está em conformidade com os dados encontrados. AMORIM e colaboradores (2017), ao estudarem a coinfeção de patógenos sexualmente transmissíveis e HPV em mulheres do estado da Bahia, encontraram alta frequência de HPV (85,5%) em participantes que apresentavam lesões cervicais. Entretanto, ao contrário do presente estudo, com relação ao grupo de mulheres com citologia normal, a frequência de HPV positivo foi bem menor (25,7%).

YUANYUE e colaboradores (2017), ao estudarem a distribuição do HPV em mulheres chinesas que apresentavam lesões e câncer invasivo, também encontraram alta prevalência de participantes com o DNA viral, com taxas variando de 90 a 100%, de acordo com o aumento da severidade das lesões. Os genótipos mais prevalentes foram os HPVs 16, 52 e 58, corroborando com os dados encontrados no presente estudo.

MARTINS e colaboradores (2016) avaliaram a distribuição de genótipos de HPV em mulheres brasileiras com e sem lesões cervicais, e obtiveram como resultado uma menor frequência de HPV positivo em relação ao estudo em questão, com resultado de 48,6%. Entretanto, o tipo viral de maior frequência foi o mesmo encontrado nesse estudo, o HPV 16 (23,2%), sendo ainda encontrados os tipos 56 (21.0 %), 52(8.7 %), 31 (7.7 %), 53 (7.7 %), 51 (7.4 %), 39, 59, 66 (6.5 % cada), 33 (5.3 %) e 58 (5 %). Ao contrário do presente estudo, estes autores encontraram uma baixa frequência com relação ao HPV 18 (5%).

Infecção por um único tipo viral foi encontrada com uma representatividade de 24,39% no grupo com lesão e 18,18% em mulheres sem lesão. Entretanto, as taxas de coinfeção nos dois grupos foram altas, 70,73% (com lesão) e 66,67% (sem lesão), sendo encontrada infecção múltipla por até três tipos virais nos dois grupos. RESENDE e colaboradores (2014)

encontraram HPV em 87% de mulheres participantes no estado de São Paulo e Goiás, com taxa de coinfeção menor que o presente estudo, de 52%. Porém, os tipos virais relatados em coinfeção foram os mesmos, HPVs 16 e 58, 16 e 52 e 16 e 18, corroborando com o nosso estudo.

Segundo ARBYN e colaboradores (2006) e CAIXETA e colaboradores (2015), a idade desempenha um papel importante na determinação da prevalência, pois a aquisição do HPV aumenta rapidamente após o início da atividade sexual, com pico de prevalência ocorrendo próximo do final da adolescência ou no início da idade adulta. RÍO-OSPINA e colaboradores (2016) verificaram a prevalência de HPV de alto risco em adolescentes colombianas, encontrando valores de positividade para o DNA viral em 48,97% das mulheres, sendo a taxa de monoinfeção de 70,62%, a qual teve como prevalência o tipo 16 (37,44%), seguido do 18 (14,99%); coinfeção foi relatada em 28,52% dos casos. Todavia, esse trabalho encontrou coinfeção pelos tipos 16, 18 e 31, assim como o presente estudo.

KAVANAGH e colaboradores (2013), ao estimarem a prevalência de HPV em mulheres escocesas, com a intenção de monitorar o impacto futuro da vacinação, encontraram frequência de coinfeção por HPVs de alto risco em 48% das participantes, sendo 58,4% infectadas por dois tipos virais, 25,6% com três tipos, 9,9% por quatro, 4,3% por cinco e 1,8% por seis. Nesse trabalho foi relatada a ocorrência de coinfeção por até oito tipos virais de alto risco e associação entre os tipos 16, 18 e 31.

Estudos demonstram o papel das infecções múltiplas por HPV (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; GHEDIRA *et al.*, 2016; YUANYUE *et al.*, 2017), bem como com relação a infecções por um único tipo viral (XU *et al.*, 2015) na persistência da infecção e no aumento da severidade das lesões.

Os dados de prevalência de HPV relacionados a faixa etária mostraram que essa infecção acomete a população jovem sexualmente ativa, com idade inferior a 30 anos (XU *et al.*, 2015). Considerando os dados do presente estudo, a prevalência de HPV encontrada está relacionada a faixa etária de 18 a 30 anos, tanto com relação a monoinfeção quanto por coinfeção.

Um estudo que analisou a infecção por HPV em mulheres de Bangladesh com neoplasia intraepitelial cervical e cervicite crônica encontrou 50% de HPV positivo na faixa etária de 20 a 30 anos (KHANDKER *et al.*, 2016).



MARTINS e colaboradores (2016) encontraram no Brasil maior frequência de HPV positivo em mulheres com idade inferior a 31 anos, sendo também relatado alto índice de infecções múltiplas nessa faixa etária (35%). A alta prevalência de HPV em adolescentes e mulheres jovens tem sido frequentemente atribuída ao início da atividade sexual, ou seja, quanto menor a idade maior a probabilidade de infecção e multiplicidade de parceiros sexuais durante a vida.

Com relação a distribuição dos genótipos e o resultado da citologia, os dados mostraram que o HPV 16 foi o mais frequente em lesões de ASC-US, seguido de LSIL, HSIL e ASC-H. FAKHERDIN e colaboradores (2015) pesquisaram a associação entre HPV e ASC-US em 297 mulheres nos Emirados Árabes. Foram detectados infecção em 17,9%, com associação entre as lesões e os genótipos de HPV 16 e 18. Em um estudo de distribuição de genótipos de HPV em mulheres com lesões na China foram encontrados os tipos 16, 51, 52 e 58 associados a LSIL, e em HSIL foram diagnosticados os tipos 16, 58, 33 e 52. Com relação ao câncer invasivo, os mais prevalentes foram HPV 16, 58 e 18 (XU *et al.*, 2015)

BALANDA e colaboradores (2016), ao estudarem a prevalência da infecção por HPV em mulheres no Chile, obtiveram diagnóstico positivo em 54% das amostras de ASC-US, 75% nas LSIL, 87% nas HSIL e 100% no CI. O trabalho encontrou associação entre HPVs de alto risco e ASC-US, seguido LSIL e HSIL. Foi relatado a ocorrência de alta prevalência de HPVs de alto risco em mulheres com citologia normal, sendo essa relação sete vezes maior do que a encontrada em mulheres com lesões.

Ao contrário do presente trabalho, um estudo sobre a prevalência dos tipos virais de alto risco oncogênico em mulheres do Chipre mostrou que a distribuição desses tipos foi similar entre as lesões ASC-US, LSIL e HSIL (62,2%, 60,7%, 57,9%), respectivamente (KRASHIAS; KOPTIDES; CHRISTODOULOU, 2017). A infecção por HPV é um fator de risco para o desenvolvimento de atipias celulares cervicais, sendo os genótipos de alto risco com maior potencial de gerar anormalidades citológicas. Os estudos mostraram que o HPV 16 presente na maioria das infecções representa um maior risco de progressão das atipias, levando ao câncer cervical. Os dados sugerem que o

HPV sozinho não é um determinante do câncer, mas contribui com o surgimento do mesmo.

Estudos recentes utilizando métodos independentes de cultivo têm demonstrado que a diversidade na composição bacteriana vaginal entre mulheres normais e afetadas pela vaginose bacteriana é bastante complexa (LING *et al.*, 2010). No presente estudo, a técnica PCR-DGGE foi utilizada para caracterizar a diversidade bacteriana vaginal de mulheres com diferentes *status* de saúde.

A técnica de DGGE é rápida e confiável para estimar a diversidade da comunidade bacteriana vaginal, permitindo a detecção de populações predominantes, não sendo detectadas populações menores. Entretanto, é uma técnica que apresenta baixa resolução, por ser dependente do tipo de oligonucleotídeos iniciadores utilizados, considerando-se os diversos níveis taxonômicos microbianos, e não permite a identificação dos microrganismos presentes na amostra, sem o sequenciamento. Ou seja, o DGGE é usual na comparação das comunidades bacterianas, considerando similaridades e diferenças (LING *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2013). A técnica é útil para a compreensão da riqueza do ecossistema vaginal, possibilitando a identificação de similaridades entre os grupos estudados. Essa compreensão é fundamental para entendermos a etiologia das doenças vaginais (CRUCIANI *et al.*, 2012; ALIOUA *et al.*, 2016).

O presente estudo caracterizou a estrutura da comunidade bacteriana de mulheres clinicamente saudáveis e com vaginose bacteriana. A análise de agrupamento para o domínio Bacteria mostrou que as amostras provenientes de mulheres com mesmo *status* de saúde tenderam a se agrupar, porém em *clusters* separados. Entretanto na análise do agrupamento em relação aos tipos de lesões, foram observados vários *clusters*, sem a formação de um padrão. Esses dados demonstram a natureza complexa da microbiota vaginal, que pode sofrer influência de fatores diversos, como a faixa etária da mulher, o tipo de dieta e o uso de anticoncepcional. Ou seja, o agrupamento obtido mostra a heterogeneidade da microbiota de mulheres com lesão e sem lesão e, ainda, mulheres com tipos de lesões diferentes. Assim, cada indivíduo terá uma composição da microbiota vaginal característica. (LING *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2013).

Por outro lado, o oligonucleotídeo iniciador universal utilizado no DGGE pode ter contribuído para a complexidade na diferenciação dos *clusters* encontrados entre as mulheres amostradas, por se tratar de um iniciador de nível taxonômico pouco discriminatório. Dessa forma, ressalta-se a necessidade da complementação do estudo com outros tipos de iniciadores ou ainda outras técnicas capazes de elucidar a composição de grupos microbianos associados aos diferentes grupos estudados.

Um estudo da diversidade do microbioma vaginal associado a neoplasia intraepitelial cervical em Londres, revelou, através de sequenciamento de nova geração (NGS) do 16S rDNA, que as mulheres com microbiota predominante da comunidade IV, caracterizada por redução de *Lactobacillus* com aumento de bactérias anaeróbias, relacionada à VB, representa um risco duas vezes maior para o desenvolvimento de LSIL e três vezes maior para HSIL. O aumento da gravidade da doença também foi associado a diminuição da abundância relativa de *Lactobacillus*. A comunidade IV está relacionada tanto com a infecção por HPV quanto com a persistência da mesma, haja vista que o ambiente vaginal em disbiose pode induzir um ecossistema pró-inflamatório, que facilita a integração do DNA viral ao genoma humano, levando a super expressão das proteínas virais, inclusive aquelas (E6/E7) responsáveis pela transformação celular (MITRA *et al.*, 2015). Durante o processo inflamatório ocorre indução de citocinas liberadas por células infectadas por HPV que estimulam o metabolismo oxidativo em macrófagos, o que gera dano no epitélio (CAIXETA *et al.*, 2015).

DI PAOLA e colaboradores (2017) identificaram a microbiota de mulheres com infecção persistente por HPV na Itália, através do sequenciamento do 16S rDNA e também encontraram associação entre a comunidade IV (VB) com a persistência da infecção por HPV e as atipias celulares. O microambiente vaginal diante de uma disbiose com ocorrência de VB, quando colonizado por bactérias anaeróbias, essas produzem enzimas e metabólitos que comprometem o biofilme protetor, facilitando a entrada do HPV e permitindo a infecção persistente.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta prevalência de HPV em mono e coinfeção, tanto em mulheres com atipias celulares quanto em mulheres clinicamente saudáveis, 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. Além disso, existe a necessidade de realização de uma educação continuada, a fim de promover conhecimento/esclarecimento a respeito da associação entre HPV, microbiota vaginal e lesões celulares cervicais, o que contribuirá para o diagnóstico precoce e redução da taxa de infecção.

Espera-se que as informações epidemiológicas e microbiológicas geradas neste estudo possam servir para caracterização do problema na região de Juiz de Fora, ou suscitar discussão e monitoramento epidemiológico em outras regiões, que sirvam de base para o desenvolvimento de políticas de saúde pública e, assim, possam contribuir para um melhor aproveitamento dos recursos financeiros a serem aplicados em medidas preventivas.

Ressalta-se a necessidade da continuidade e o aprofundamento desta linha de pesquisa utilizando-se outras técnicas, como por exemplo, o sequenciamento de componentes da comunidade microbiana, pela oportunidade de elucidar algumas questões, principalmente aquelas associadas aos fatores de risco relacionados a VB e infecção por HPV, que podem levar ao aparecimento de atipias celulares cervicais e ao desenvolvimento do câncer de colo do útero.

## 8. CONCLUSÕES

- Embora o HPV e a ocorrência de lesões intraepiteliais cervicais possa estar associado a qualquer faixa etária, ele está mais relacionado a mulheres adultas jovens, na faixa etária entre 18-30 anos.
- As mulheres sexualmente ativas, com mais de um parceiro, tabagistas e usuárias de contraceptivos orais estão mais propensas à infecção por HPV e ao desenvolvimento de alterações celulares cervicais.
- Nos dois grupos estudados, a maioria das mulheres apresentou escore normal para a vaginose bacteriana.
- A maioria das mulheres apresentou infecção por HPV, e os genótipos encontrados foram HPV 16, 18, 31, 52 e 58, sendo o HPV 16 e HPV 18 os tipos virais de alto risco oncogênicos mais prevalentes na população amostrada.
- Monoinfecção e coinfecção por mais de um tipo viral está presente em alta frequência nas mulheres amostradas, com e sem lesão celular.
- A avaliação da estrutura da comunidade bacteriana vaginal revelou que a microbiota vaginal é complexa.
- Lesão do tipo ASC-US foi encontrado na maioria das mulheres amostradas, estando associadas ao HPV 16, ao passo que o HPV 18 foi encontrado associado à lesão HSIL.
- Associação positiva foi encontrada entre lesão do tipo ASC-H e HSIL com a ocorrência de vaginose bacteriana.
- A correlação entre o escore de Nugent e a estrutura da comunidade bacteriana, assim como em relação entre a presença ou não de atipias celulares revelou a heterogeneidade da microbiota vaginal, sugerindo a

necessidade da utilização de outras técnicas capazes de elucidar a composição de grupos microbianos específicos, para um melhor entendimento da relação entre o HPV, microbiota vaginal e lesões celulares cervicais.

## REFERÊNCIAS

ALIOUA, Souad *et al.* Diversity of vaginal lactic acid bacterial microbiota in 15 Algerian pregnant women with and without bacterial vaginosis by using culture independent method. **Journal of Clinical and Diagnostic Research** v. 10, n. 9, p. DC23-DC27 , 2016.

ALVES, Patrícia *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.

AMSEL,R.; TOTTEN, P.A.; SPLEGEL, C.A.; CHEN, K.C.S.; ESCHENBACH, D.A.; HOLMES, K.K. Non-specific vaginitis: diagnostic criteria and microbial epidemiologic association. **Am J. Med.** v. 74, p. 14-22, 1983.

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).

BALANDA, Monserrat *et al.* Prevalence of human papillomavirus infection among women presenting for cervical cancer screening in Chile, 2014–2015. **Medical Microbiology and Immunology** v. 205, n. 6, p. 585–594 , 2016.1432-1831.

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>>.

BAUTISTA, Christian T. *et al.* Bacterial vaginosis: A synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. **Military Medical Research** v. 3, n. 1, p. 1–10 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40779-016-0074-5>>.2095-7467 (Print)r2054-9369 (Linking).

BERTOLOZZI, Maria Rita *et al.* Os conceitos de vulnerabilidade e adesão na Saúde Coletiva. **Revista da Escola de Enfermagem da USP** v. 43, n. 2, p. 1326–1330 , 2009. Disponível em: <[www.ee.usp.br/reeusp/](http://www.ee.usp.br/reeusp/)>.

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.

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).

CAIXETA, R.C.A.; RIBEIRO, A.A.; SEGATTI, K.D.; SADDI, V.A.; ALVES, R.R.F.; CARNEIRO, M.A.S.; SANTOS, S.H.R. Association between the human papillomavirus, bacterial vaginosis and cervicitis and the detection of abnormalities in cervical smears from teenage girls and young women. *Diagnostic Cytopathology*, V. 43, N. 10. 2015.

CASSAMASSIMO DUARTE, Marli Teresinha. Saúde sexual e reprodutiva de mulheres vivendo com HIV/Aids atendidas em hospital dia. **Sexual and reproductive health of women living with HIV/Aids attended to at the outpatient hospital.** v. 16, n. 43, p. 1126–1127 , 2012. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ehh&AN=110737664&lang=es&site=ehost-live>>.

CHABAN, Bonnie *et al.* Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle. **Microbiome** v. 2, n. 1, p. 23 , 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4106219&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.2049-2618.

CHARBONNEAU, Mark R *et al.* A microbial perspective of human developmental biology. **Nature** v. 535, n. 7610, p. 48–55 , 2016.0028-0836.

CHATURVEDI, Anil K *et al.* Human Papillomavirus Infection with Multiple Types : Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. v. 203 , 2011.

CHAVAN, Smita *et al.* Study of Pap smear and other feasible tests among self reported symptomatic married women in reproductive age group (15-49 yrs) regarding reproductive tract infections in a rural community of Maharashtra. **International Journal of Research in Medical Sciences** v. 1, n. 4, p. 545 , 2013. Disponível em: <<http://www.scopemed.org/?mno=45412>>.

CRUCIANI, Federica *et al.* Efficacy of rifaximin vaginal tablets in treatment of bacterial vaginosis: A molecular characterization of the vaginal microbiota. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 56, n. 8, p. 4062–4070 , 2012.1098-6596 (Electronic)r0066-4804 (Linking).

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 (hvp) infection: Lessons from Valgent (Validation of HPV Genotyping Tests). **Journal of Clinical Microbiology** v. 54, n. 9, p. 2337–2342 , 2016.



DE OLIVEIRA, Gisele R. *et al.* Characterisation of complete high- and low-risk human papillomavirus genomes isolated from cervical specimens in southern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 112, n. 10, p. 728–731 , 2017.

DE RODA HUSMAN, A. M. *et al.* The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology** v. 76, n. 4, p. 1057–1062 , 1995.0022-1317.

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).

DEMAZOIN, Marie-christine *et al.* Human Papillomavirus Types Distribution in Organised Cervical Cancer Screening in France. v. 8, n. 11, p. 1–7 , 2013.

DI PAOLA, Monica *et al.* Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. **Scientific Reports** v. 7, n. 1, p. 1–12 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>>.

DICKSON, Elizabeth Louise *et al.* Multiple-Type Human Papillomavirus (HPV) Infections. **International Journal of Gynecological Cancer** v. 23, n. 7, p. 1295–1302 , 2013. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00009577-201309000-00022>>.

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).

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).

FAKHERDIN, M.; ELMASRY, K. Improving the performance of reflex Human Papilloma Virus (HPV)testing in triaging women with atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS): A retrospective study in a tertiary hospital in United Arab Emirates (UAE). **Vaccine**, v.12, n. 11. 2015.

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.

FIGUEIREDO ALVES, R R *et al.* Prevalence, genotype profile and risk factors for multiple human papillomavirus cervical infection in unimmunized female adolescents in Goiania, Brazil: a community-based study . **BMC Public Health** v. 13, p. 1041 , 2013. Disponível em: <[internal-pdf://120.223.106.85/FigueiredoAlve-2013-Prevalence\\_genotype\\_prof.pdf](internal-pdf://120.223.106.85/FigueiredoAlve-2013-Prevalence_genotype_prof.pdf)%5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819257/pdf/1471-2458-13-1041.pdf>>.1471-2458 (Electronic) 1471-2458 (Linking).

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).

GAO, Weijiao *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, p. 271 , 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3684509&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.1471233413.

GININDZA, Themba G. *et al.* Prevalence and risk factors associated with sexually transmitted infections (STIs) among women of reproductive age in Swaziland. **Infectious Agents and Cancer** v. 12, n. 1, p. 1–12 , 2017.1750-9378.

GHEDIRA, R. *et al.* Human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants distribution among Tunisian women with normal cytology and squamous intraepithelial lesions. **Infectious Agents and Cancer** v. 11, n. 1, p. 1–10 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13027-016-0109-2>>.

GREENE, John F.; KUEHL, Thomas J.; ALLEN, Steven R. The Papanicolaou smear: Inadequate screening test for bacterial vaginosis during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** v. 182, n. 5, p. 1048–1049 , 2000.

GUO, Y. L. *et al.* Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. **Int J STD AIDS**. Reino Unido, v. 23, n. 08, p. 581-584, Ago. 2012.

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).

ILKIT, Macit; GUZEL, Ahmet Baris. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. **Critical reviews in microbiology** v. 37, n. 3, p. 250–261 , 2011.1549-7828 (Electronic)r1040-841X (Linking).

INCA. **Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil**. [S.l: s.n.], 2015. 1-126 p. .78-85-7318-283-5.

INCA. Diretrizes Brasileiras do Ministério da Saúde, p. 1-116. 2016.

INCA. **Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil**, p. 1-130, 2018.

KANG, Le-Ni *et al.* A prospective study of age trends of high-risk human papillomavirus infection in rural China. **BMC Infectious Diseases** v. 14, n. 1, p. 96 , 2014. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-96>>.

KAVANAGH, Kimberley *et al.* Estimation of HPV prevalence in young women in Scotland; monitoring of future vaccine impact. **BMC Infectious Diseases** v. 13, n. 1, p. 1 , 2013. Disponível em: <BMC Infectious Diseases>.

KENYON, Chris; COLEBUNDERS, Robert; CRUCITTI, Tania. The global epidemiology of bacterial vaginosis: A systematic review. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** v. 209, n. 6, p. 505–523 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2013.05.006>>.1097-6868 (Electronic)r0002-9378 (Linking).

KHANDKER, Elisha; KHAN, Mansura; CHOWDHURY, Ahesh Kumar. Human papillomavirus infection among Bangladeshi women with cervical intraepithelial neoplasia and chronic cervicitis. p. 8–11 , 2016.

KJÆR, Susanne K. *et al.* Carcinogenic HPV prevalence and age-specific type distribution in 40,382 women with normal cervical cytology, ASCUS/LSIL, HSIL, or cervical cancer: What is the potential for prevention? **Cancer Causes and Control** v. 25, n. 2, p. 179–189 , 2014.1573-7225.

KONDO, Kazunari *et al.* Genotype Distribution of Human Papillomaviruses in Japanese Women with Abnormal Cervical Cytology. p. 277–283 , 2012.

KRASHIAS, George; KOPTIDES, Dana; CHRISTODOULOU, Christina. HPV prevalence and type distribution in Cypriot women with cervical cytological abnormalities. **BMC Infectious Diseases** v. 17, n. 1, p. 1–10 , 2017.

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://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-488>>.8657187072577.

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>>.

MARIANI, Luciano; VICI, Patrizia; SULIGOI, Barbara. Early Direct and Indirect Impact of Quadrivalent HPV ( 4HPV ) Vaccine on Genital Warts : a Systematic Review. p. 10–30 , 2015.

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 *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>%5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27515763>%5Cn<http://www.pubmedcentral.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).

MENDLING, Werner *et al.* Use of locally delivered dequalinium chloride in the treatment of vaginal infections: a review. **Archives of Gynecology and Obstetrics** v. 293, n. 3, p. 469–484 , 2016.0932-0067.

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>%5Cn<http://www.pubmedcentral.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>%5Cn<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc2886>>.1474-1768 (Electronic)r1474-175X (Linking).

MOREIRA MASCARENHAS, Rita Elizabeth *et al.* Prevalence and risk factors for bacterial vaginosis and other vulvovaginitis in a population of sexually active adolescents from Salvador, Bahia, Brazil. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology** v. 2012 , 2012.1098-0997 (Electronic)r1064-7449 (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 sialidases e carga bacteriana Mariana Morena de Vieira Santos Greatti Flora intermediária em m. , 2014.

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>>.

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).

NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **Journal of Clinical Microbiology** v. 29, n. 2, p. 297–301 , 1991.0095-1137 (Print).

O'HANLON, Deirdre E.; MOENCH, Thomas R.; CONE, Richard A. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. **PLoS ONE** v. 8, n. 11, p. 1–8 , 2013.1932-6203.

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.

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.

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).

PINHO-FRANÇA, José De Ribamar; CHEIN, Maria Bethânia Da Costa; THULER, Luiz Claudio Santos. Patterns of cervical cytological abnormalities according to the Human Development Index in the northeast region of Brazil. **BMC Women's Health** v. 16, n. 1, p. 1–10 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12905-016-0334-2>>.

PURAN, Alexie C *et al.* Incidental Findings of Bacterial Vaginosis and Other Infections in Papanicolaou Smears of HIV-infected and HIV-uninfected Adolescent Females in South Africa. **Journal of AIDS and HIV research (Online)** v. 6, n. 9, p. 172–176 , 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4655602&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

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 *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).

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).

RÍO-OSPINA, Luisa Del *et al.* The prevalence of high-risk HPV types and factors determining infection in female colombian adolescents. **PLoS ONE** v. 11, n. 11, p. 1–15 , 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).

SALAZAR, Katrina L *et al.* Multiple Human Papilloma Virus Infections and Their

Impact on the Development of High-Risk Cervical Lesions. p. 391–398 , 2015.

SCHIFFMAN, Mark *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers** v. 2, p. 16086 , 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp201686>>.

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.

SERRANO, Beatriz *et al.* Potential impact of a 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil, Mexico, India and China). **Cancer Epidemiology** v. 38, n. 6, p. 748–756 , 2014.1877-7821.

SERRANO, Beatriz *et al.* Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. **Infectious agents and cancer** v. 7, n. 1, p. 38 , 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3554470&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.1750-9378 (Electronic)r1750-9378 (Linking).

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)>.

SHANNON, B *et al.* Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. **Mucosal Immunology** n. January, p. 1–10 , 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/mi.2016.129>>.

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).

SODHANI, P. *et al.* Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: Is there an association or is co-existence incidental? **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** v. 18, n. 5, p. 1289–1292 , 2017.

SOHRABI, Amir *et al.* Is incidence of multiple HPV genotypes rising in genital infections? **Journal of Infection and Public Health** p. 4–7 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2016.10.006>>.

SRINIVASAN, Sujatha *et al.* Metabolic Signatures of Bacterial Vaginosis. v. 6, n. 2, p. 1–16 , 2015.

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.

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).

TUROVSKIY, Yevgeniy *et al.* The etiology of Bacterial Vaginosis. **Journal of Applied Microbiology** v. 110, n. 5, p. 1105–1128 , 2011.

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.

VAN DE WIJGERT, Janneke H H M *et al.* The vaginal microbiota: What have we learned after a decade of molecular characterization? **PLoS ONE** v. 9, n. 8 , 2014.1932-6203; 1932-6203.

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)>.

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).

WEISSENBACHER, T. *et al.* Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detection of Candida species by culture and polymerase chain reaction. **Archives of Gynecology and Obstetrics** v. 279, n. 2, p. 125–129 , 2009.0040400806819.

WIRA, Charles R; RODRIGUEZ-GARCIA, Marta; PATEL, Mickey V. reproductive tract. v. 15, n. 4, p. 217–230 , 2016.

WITKIN, SS; LINHARES, IM. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology** p. 1–6 , 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1471-0528.14390>>.

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).

XU, Xiao Xian *et al.* Distribution of HPV genotype in invasive cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia in Zhejiang Province, Southeast China: Establishing the baseline for surveillance. **International Journal of**



**Environmental Research and Public Health** v. 12, n. 9, p. 10794–10805 , 2015.8657188128112.

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 , 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880111>>.

YASUKO, Lúcia *et al.* Potencialidade do conceito de vulnerabilidade para a compreensão das doenças transmissíveis □. v. 45, p. 1769–1773 , 2011.

YUANYUE, Li *et al.* The distribution of human papillomavirus genotypes in cervical cancer and intraepithelial neoplasia lesions among Chinese women in Yunnan Province. **Journal of Infection and Public Health** p. 6–11 , 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876034117301739>>.

ZHANG, Dai *et al.* Epidemiological investigation of the relationship between common lower genital tract infections and high-risk human papillomavirus infections among women in Beijing , China. p. 1–11 , 2017.

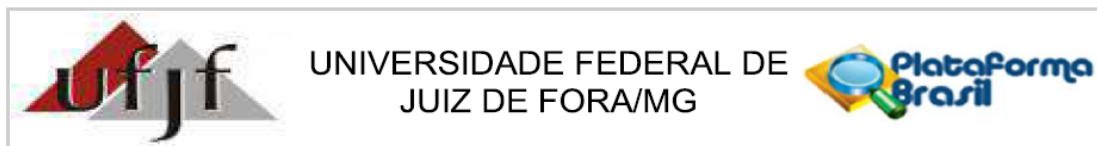
ZUNA, Rosemary E *et al.* Distribution of HPV genotypes in 282 women with cervical lesions: evidence for three categories of intraepithelial lesions based on morphology and HPV type. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc** v. 20, n. 2, p.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

### APÊNDICE I - Classificação das amostras de acordo o Escore de Nugent

Amostra	Gram +	Gram -	Gram variáveis e Gram - pequenos	Clue cells	PMN	Escore de Nugent
1	0 (4)	>5 (2)	5-30 (3)	S	S	9 (VB)
2	5-30 (1)	1-4 (1)	0 (0)	N	S	2 (NORMAL)
3	1-4 (2)	1-4 (1)	0 (0)	N	S	3 (NORMAL)
4	0 (4)	1-4 (1)	1-4 (2)	N	N	7 (VB)
5	0 (4)	0 (0)	5-30 (3)	S	N	7 (VB)
6	5-30 (1)	1-4 (1)	0 (0)	N	N	2 (NORMAL)
7	0 (4)	1-4 (1)	5-30 (3)	S	S	8 (VB)
8	>30 (0)	0 (0)	0 (0)	N	N	0 (NORMAL)
9	5-30 (1)	1-4 (1)	0 (0)	N	S	2 (NORMAL)
10	1-4 (2)	1-4 (1)	1-4 (2)	N	S	5 (INTERMEDIÁRIO)
11	5-30 (1)	1-4 (1)	1-4 (2)	S	N	4 (INTERMEDIÁRIO)
12	0 (4)	1-4 (1)	>30 (4)	S	S	9 (VB)
14	0 (4)	>5 (2)	>30 (4)	S	S	10 (VB)
15	>30 (0)	0 (0)	0 (0)	N	N	0 (NORMAL)
16	>30 (0)	0 (0)	0 (0)	N	N	0 (NORMAL)
17	>30 (0)	0 (0)	0 (0)	N	N	0 (NORMAL)
18	>30 (0)	1-4 (1)	0 (0)	N	N	1 (NORMAL)
19	0 (4)	1-4 (1)	>30 (4)	S	S	9 (VB)
20	5-30 (1)	1-4 (1)	1-4 (2)	S	S	4 (INTERMEDIÁRIO)
21	0 (4)	>5 (2)	>30 (4)	S	S	10 (VB)
22	>30 (0)	0 (0)	0 (0)	N	N	0 (NORMAL)
23	5-30 (1)	0 (0)	0 (0)	N	N	1 (NORMAL)
24	0 (4)	1-4 (1)	5-30 (3)	S	S	8 (VB)
25	0 (4)	1-4 (1)	>30 (4)	S	S	9 (VB)
26	>30 (0)	0 (0)	0 (0)	N	N	0 (NORMAL)
27	0 (4)	1-4 (1)	5-30 (3)	S	S	8 (VB)
28	0 (4)	1-4 (1)	>30 (4)	S	S	9 (VB)
29	5-30 (1)	0 (0)	0 (0)	N	N	1 (NORMAL)
30	>30 (0)	1-4 (1)	0 (0)	N	N	1 (NORMAL)
31	5-30 (1)	0 (0)	0 (0)	N	N	1 (NORMAL)
32	5-30 (1)	1-4 (1)	0 (0)	N	S	2 (NORMAL)

## 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 ECOSSISTEMA 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:** FUNDAÇÃO 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 N° 001/2013 CNS.

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

1) Além da Resolução N° 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

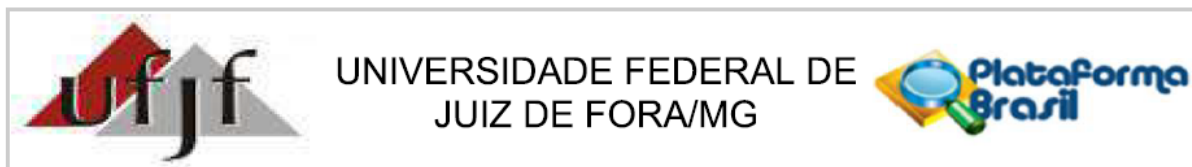
**UF:** MG

**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@uff.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



PREFEITURA MUNICIPAL DE JUIZ DE FORA  
SECRETARIA DE SAÚDE  
SUBSECRETARIA DE ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE



Resultado		Grau de suspeição	Conduta	
Normal	Dentro dos limites da normalidade no material examinado	Não	Seguir a rotina de rastreamento citológico	
	Alterações celulares benignas reativas ou reparativas; inflamação sem identificação do agente	Não	Seguir a rotina de rastreamento citológico	
	Resultado indicando metaplasia escamosa imatura	Não	Seguir a rotina de rastreamento citológico	
	Resultado indicando reparação	Não	Seguir a rotina de rastreamento citológico	
	Resultado indicando atrofia com inflamação	Não	Seguir a rotina de rastreamento citológico <sup>11</sup>	
	Resultado indicando radiação	Não	Seguir a rotina de rastreamento citológico	
	Resultado indicando achados microbiológicos ( <i>Lactobacilos sp.</i> , cocos e outros bacilos)	Não	Seguir a rotina de rastreamento citológico <sup>12</sup>	
	Outras situações	Não	Seguir a rotina de rastreamento citológico	
Atipias de significado indeterminado	Em células escamosas	Provavelmente não neoplásica	Menor	Repetição da citologia em 6 meses (> 30 anos) ou 12 meses (< 30 anos)
		Não se pode afastar lesão de alto grau	Maior	Encaminhar para colposcopia
	Em células glandulares	Provavelmente não neoplásica	Maior	Encaminhar para colposcopia
		Não se pode afastar lesão de alto grau	Maior	Encaminhar para colposcopia
	De origem indefinida	Provavelmente não neoplásica	Maior	Encaminhar para colposcopia
		Não se pode afastar lesão de alto grau	Maior	Encaminhar para colposcopia
Atipias em células escamosas	Lesão intraepitelial de baixo grau		Menor	Repetição da citologia em seis meses
	Lesão intraepitelial de alto grau		Maior	Encaminhar para colposcopia
	Lesão intraepitelial de alto grau, não podendo excluir microinvasão		Maior	Encaminhar para colposcopia
	Carcinoma epidermoide invasor		Maior	Encaminhar para colposcopia
Atipias em células glandulares	Adenocarcinoma <i>in situ</i> Adenocarcinoma invasor		Maior	Encaminhar para colposcopia
	Adenocarcinoma invasor		Maior	Encaminhar para colposcopia

<sup>11</sup> Se laudo do exame citopatológico, mencionar dificuldade diagnóstica decorrente da atrofia: deve ser prescrito um preparo estrogênico para tratamento da colpíte atrófica, e a nova citologia será coletada sete dias após a parada do uso.

<sup>12</sup> A paciente com sintomatologia como corrimento, prurido ou odor genital, deve ser tratada e acompanhada conforme orientações do Manual de DST do MS.

## ANEXO IIIA



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 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 IIIB



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 (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@ufjf.edu.br](mailto:vania.silva@ufjf.edu.br)

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

## ANEXO IV

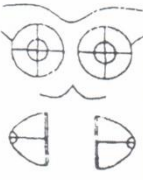

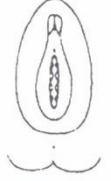
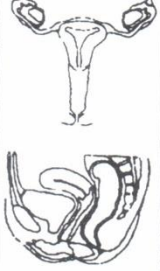
SUS - JF  
Secretaria Municipal de Saúde  
INSTITUTO DA MULHER




## 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: _____	
osteoporose: _____		Aleitamento: _____	
alergia: _____		1º Coito: _____ Nº parceiros: _____	
virose: _____		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	CNPJ (CPF)
Data de Nascimento	Idade		
Dados Residenciais			
Logradouro			
Número	Complemento		
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 congênitas 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
- Piócitos 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 - Diagnóstico laboratorial (Escore de Nugent)

Escore de Nugent		
Tipo morfológico	Número de microrganismos/ campo	Pontuação
<i>Lactobacillus</i> spp. (Bacilos Gram positivo)	>30	0
	5-30	1
	1-4	2
	1	3
	0	4
<i>Mobiluncus</i> spp. (Bacilos Gram negativos curvos)	5	2
	1-4	1
	0	0
<i>Gardnerella vaginalis/Bacteroides</i> sp (Bacilos Gram variáveis e Gram negativos pequenos)	>30	4
	5-30	3
	1-4	2
	1	1
	0	0

Some os pontos obtidos e verifique a interpretação	
Pontuação	Interpretação
0-3	Normal
4-6	Intermediário
7-10	Vaginose bacteriana

Fonte: Adaptado de Nugent, Krohn e Hillier (1991).