



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

ÉVELYN COSTA LIRA

DIVERSIDADE MICROBIANA DO TRATO GENITAL FEMININO

**MANAUS
2017**

ÉVELYN COSTA LIRA

DIVERSIDADE MICROBIANA DO TRATO GENITAL FEMININO

Tese apresentada ao **Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas** para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologias para a Saúde

ORIENTADORA: PROF^a DR^a CRISTINA MARIA BORBOREMA DOS SANTOS
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. SPARTACO ASTOLFI FILHO

MANAUS
2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L768d Lira, Evelyn Costa
Diversidade microbiana do trato genital feminino / Evelyn Costa
Lira. 2017
140 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cristina Maria Borborema dos Santos
Coorientador: Spartaco Astolfi Filho
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Diversidade microbiana. 2. Vagina. 3. Gene 16S rRNA. 4. Bactéria. 5. Ion PGM. I. Santos, Cristina Maria Borborema dos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ÉVELYN COSTA LIRA

DIVERSIDADE MICROBIANA DO TRATO GENITAL FEMININO

Tese apresentada ao **Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas** para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologias para a Saúde

Aprovada em 30 de novembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Cristina Maria Borborema dos Santos, Presidente
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof. Dr. Daniel Saito, Membro
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Vianna Pereira, Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof^ª. Dr^ª. Danielle Albuquerque Pires Rocha, Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof^ª. Dr^ª. Lorena Nacif Marçal, Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

“Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus,
daqueles que são chamados segundo o seu propósito.”
Romanos 8:28

Dedico esta Tese...
a minha avó d. Mariza Mirtes,
aos meus pais Carlos e Sheylla,
aos meus irmãos Cristyane e André,
aos meus cunhados João Felipe e Naiane,
ao meu sobrinho Arthur Costa,
ao meu marido Erick.

AGRADECIMENTOS

A Deus, “Ele é a paz na minha estrada, a doce companhia do meu coração, o ombro amigo onde despejo minhas mágoas, o meu sorriso mais sincero, esperança a cada novo amanhecer, o amor seguro que ninguém pode roubar...” Sou grata por me permitir continuar, por me moldar, por me ensinar, por me corrigir e me amar. A Ti somente seja toda a honra, a glória e o louvor. A canção da minha vida é tua.

A minha pequena família: Erick por ser amigo, companheiro e por me incentivar.

A minha grande família: meus pais, irmãos, cunhados e sobrinho lindo. Vocês são a base do que sou. São essenciais em cada passo meu e em cada sorriso. Amo vocês.

A Prof^a. Dr^a. Cristina Maria Borborema dos Santos, minha orientadora, por toda a confiança, a perseverança, os conselhos, o respeito. Por sempre buscar o melhor em paz com os outros e com a amabilidade e sinceridade que lhe são características.

Ao Prof^o. Dr. Spartaco Astolfi Filho, pelo exemplo, humildade, cuidado, proteção, envolvimento e segurança oferecidos a mim ao longo destes catorze anos. Pessoa maravilhosa, de simplicidade inimaginável.

A amiga Enedina Assunção, não só por me ouvir, mas por insistir em mim, pela disponibilidade sempre, pelo carinho, pelos abraços, pelo cuidado. O zelo te acompanha, porque o amor se faz presente.

Aos queridos Lucas Munareto, Priscila Rocha e Arine Heloíse. Com vocês eu chorei, eu sorri, eu briguei, eu teimei, eu insisti, eu aprendi, eu segui. É lindo poder vê-los em sua caminhada com dedicação e amor a esta ciência de cada dia.

Aos companheiros do CAM, Eliane Carvalho, Pâmella Rosa, Lorena Nacif, Anita Souza e todos aqueles que vieram e foram. Pelas distrações, piadas, sorrisos, comilanças e companhia em tantos momentos.

As amigas da Uninorte, Henriette Soares, Adriana Bentes e Lorena Soares pela verdade, pelo amor, pela convicção e suporte nos dias mais difíceis. Pelos lanches e tortas como terapia. Pelo choro e pela alegria. Com certeza essa minha caminhada não seria a mesma sem vocês. Espero poder retribuí-las da melhor maneira possível.

As irmãs mais fofas e lindas mundo, as quais não poderia deixar de lembrar, Carla Virgínia e Mylena Lopes. Vocês são parte da minha caminhada, são parte da minha vontade e disposição para continuar. Jamais desistam.

As meninas que se tornaram mais chegadas que irmãs, Larissa Kirsch, Lilyanne Garcez e Carol Furtado. Adoro sorrir com vocês, brigar com vocês, conhecer novos lugares para comer. Companheirismo e união de onde eu realmente não esperava.

A Samanta Sevalho, minha amiga de sempre, irmã separada na maternidade, pelo carinho, pela compreensão, pelo otimismo, pela convicção, pela determinação em construir essa cumplicidade ao longo dos anos.

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente deste lindo estudo, fosse nos dias de coleta, de entrevistas, de trabalho, de laboratório ou de rua. A enfermeira Samuelle, pelo auxílio e ensino, ao Dr. Luiz Carlos, pela confiança e paciência em ajudar e ensinar, em demonstrar e permitir. Muito obrigada.

A Tainá Raiol e Gleici Sena, pelas contribuições quanto às análises bioinformáticas e estatísticas, respectivamente, as quais permitiram a visualização da grandeza desta pesquisa.

Aos Coordenadores e secretaria da PPGBIOTEC por esses anos de dedicação e investimentos em vidas que podem produzir, que podem gerar frutos, que podem fazer mais do que imaginam. As cobranças nos fazem ir além.

A FAPEAM pelo auxílio financeiro para que este estudo pudesse ser desenvolvido.

A SEMSA de Manaus e Coordenador do Laboratório Sebastião Marinho, pela permissão e apoio logístico para as que as coletas pudessem ser realizadas.

RESUMO

O papel da microbiota humana nos processos de saúde e doença tem recebido maior atenção devido à facilidade para a caracterização das comunidades microbianas utilizando os métodos independentes de cultivo, que se baseiam na análise das regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA. A microbiota vaginal é habitada por comunidades microbianas que exercem papel importantíssimo para a manutenção da homeostase vaginal e prevenção da colonização por microrganismos patogênicos, mas os mecanismos pelos quais exercem essa influência ainda não são tão bem definidos. Neste contexto, uma compreensão quanto a sua abundância relativa e variações é necessária para o reconhecimento de microrganismos patogênicos potenciais e de processos fisiológicos de proteção dessa microbiota. Este estudo avaliou a diversidade microbiana vaginal em quatro condições distintas: I. microbiota autóctone; II. Microbiota apresentando candidose vaginal; III. microbiota apresentando vaginose bacteriana e; IV. microbiota apresentando lesões pré-malignas e malignas do colo do útero. Amostras cervicais de 187 mulheres foram coletadas, caracterizadas e diagnosticadas a nível molecular quanto à presença de HPV, *C. trachomatis*, *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae*. Amostras HPV+ foram genotipadas em ABI 3500 e a co-infecção do HPV foi relacionada à presença dos outros patógenos e fatores sócio-econômicos e clínicos obtidos através do questionário preenchido pelas voluntárias. Análises de significância e associação foram realizadas através dos Testes Qui-Quadrado de *Pearson*, Exato de *Fischer* e *Kruskal-Wallis* utilizando o R 2.9.0. Após a composição dos grupos, foram montadas quatro bibliotecas de *amplicons* das regiões V1-V2 do gene 16S rRNA e, posteriormente sequenciadas em plataforma Ion PGM. As sequências geradas foram analisadas utilizando o QIIME e classificadas por comparação no banco Greengenes. A prevalência encontrada para HPV foi de 51,33% sendo que os tipos mais prevalentes foram HPV 16, 58 e 33. As prevalências encontradas para CT e TV foram de 6,42% e 12,83%, respectivamente, sendo observadas co-infecção HPV/CT em 5,20% e HPV/TV em 6,25% das mulheres. O DNA de *N. gonorrhoeae* não foi encontrado nas amostras. Quanto à estimativa da diversidade microbiana, o número de amostras sequenciado foi suficiente para garantir a cobertura da diversidade total encontrada. A abundância geral revelou predominância do gênero *Lactobacillus* nos quatro grupos de estudo, seguido pelos gêneros *Ureaplasma*, *Prevotella* e *Shuttleworthia* entre os grupos estudados. A maior diversidade microbiana foi encontrada no grupo Vaginose, tendo como gêneros mais abundantes *Prevotella*, *Shuttleworthia* e *Megasphaera*, seguido pelo grupo Lesão, com abundância dos gêneros *Ureaplasma*, *Prevotella* e *Shuttleworthia*. As diferenças a nível de espécie são extremamente necessárias para o entendimento do papel fisiológico da microbiota vaginal na manutenção do equilíbrio autóctone e de mecanismos patogênicos no desenvolvimento de doenças relacionadas à microbiota vaginal. Além disso, uma compreensão da funcionalidade dos tipos de CST é necessária para complementar o que já sabemos sobre sua estrutura. Estudos são necessários para investigar as mudanças e a estabilidade desta microbiota.

Palavras-Chave: diversidade microbiana, vagina, gene 16S rRNA, bactéria, Ion PGM.

ABSTRACT

The role of the human microbiota in health and disease processes has received increased attention due to the ease of characterization of microbial communities using independent culture methods, which are based on the analysis of hypervariable regions of the gene 16S rRNA. The vaginal microbiota is inhabited by microbial communities that play a very important role in the maintenance of vaginal homeostasis and in the presence of colonization by pathogenic microorganisms, but the mechanisms by which they exert this influence are not yet so well defined. In this context, an understanding of their relative abundance and variations is necessary for the recognition of potential pathogenic microorganisms and the physiological processes of protection of this microbiota. This study evaluated the vaginal microbial diversity in four different conditions: I Microbiota Normal II Vaginal Candidosis Microbiota III Bacterial vaginosis microbiota IV microbiota presenting pre-malignant and malignant lesions of the cervix. Cervical samples from 187 women were collected, characterized and diagnosed at the molecular level for the presence of HPV, *C. trachomatis*, *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae*. HPV positive samples were genotyped at ABI 3500 and HPV co-infection were related to the presence of other pathogens and socio-economic and clinical factors obtained through the questionnaire filled out by the volunteers. Significance and association analyzes were performed using the Chi-square Test of Pearson, exact of Fischer's Test and Kruskal-Wallis test using R 2.9.0. After the groups were composed, four libraries of amplicons of the regions V1-V2 of the gene 16S rRNA and, later sequenced on Ion PGM platform. The sequences generated were analyzed using the QIIME and classified by comparison in the Greengenes database. The prevalence found for HPV was 51.33%, and the most prevalent types were HPV 16, 58 and 33. The prevalence found for CT and TV were 6.42% and 12.83%, respectively, with co- HPV / CT infection in 5.20% and HPV / VT in 6.25% of the women. The DNA of *N. gonorrhoeae* were not found in samples. As to the estimation of microbial diversity, the number of samples sequenced was enough to guarantee coverage of the total diversity found. Overall abundance revealed a predominance of the genus *Lactobacillus* on the four study groups, followed by the genera *Ureaplasma*, *Prevotella* and *Shuttleworthia*, followed by the study groups. The greatest microbial diversity was found in the vaginosis group, with the most abundant genera *Prevotella*, *Shuttleworthia* and *Megasphaera*, followed by the lesion group, abundance of genera *Ureaplasma*, *Prevotella* e *Shuttleworthia*. The differences at the species level are extremely necessary for the understanding of the physiological role of the vaginal microbial in the maintenance of autochthonous balance and of pathogenic mechanisms in the development of diseases related to vaginal microbiota. In addition, an understanding of the functionality of the types of CST is necessary to complement what we already know about its structure. Studies are needed to investigate the changes and stability of this microbiota.

Key words: microbial diversity, vagina, 16S rRNA gene, bacterium, sexually transmitted pathogens.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Progressão de lesões pré-malignas e malinas do colo do útero para câncer cervical. As células da camada basal se organizam acima do tecido conjuntivo da derme. O Papilomavírus Humano (HPV) invade as células basais por meio de micro-abrasões no epitélio cervical. Após sua infecção, os early genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos e o DNA viral começa a ser replicado em sua forma episomal (células com núcleos roxos). Nas camadas superiores do epitélio (camadas intermediária e superficial) o genoma viral é replicado ainda mais, e os late genes L1, L2 e E4 são expressos. L1 e L2 começam a encapsidação das partículas virais e iniciam novas infecções. Nas lesões do tipo LSIL começa a replicação produtiva. Uma parte das infecções por HPV de alto risco progridem para HSIL. A progressão das lesões não tratadas para o câncer invasivo está associada à integração do genoma do HPV no DNA do hospedeiro (núcleos vermelhos), com perda de E2 e, subsequente, super-expressão dos oncogenes E6 e E7. LCR, região de controle comprida. Fonte: modificado de WOODMAN et al., 2007..... 32
- Figura 2** Fluxo de Procedimentos. Principais etapas para o desenvolvimento deste estudo (verde)..... 40
- Figura 3** Esquema demonstrativo da PCR clonal ou de emulsão, em que os fragmentos são ligados às IonSpheres (pequenas esferas) através de *primers* P1 (sequências complementares ao adaptador P1), que se encontra na superfície das esferas. Um único fragmento se liga a uma determinada esfera. Essas esferas são capturadas individualmente em gotículas oleosas (microreatores) onde a PCR em emulsão ocorre. Nesse processo, são gerados milhares de cópias de cada fragmento. Fonte: CARVALHO; SILVA, 2010..... 53
- Figura 4** Sequenciamento em Ion Torrent. A. Esquema demonstrando a incorporação de uma única ISP para cada poço do Ion Chip 318 v2. B. Durante o sequenciamento, a Taq polimerase incorpora uma base sendo então liberado um fosfato e um H⁺, o qual é detectado por um sensor de pH que transforma a mudança de pH em um sinal elétrico. Fonte: MARDIS, 2008; VARUZZA, 2016..... 54

ARTIGO 2

- Figura 1** Curvas de Rarefação utilizadas para estimar a riqueza microbiana e Médias da diversidade alfa. A. As curvas de rarefação mostram o número de OTUs por amostra gerados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA para cada grupo de estudo. Normal (amarelo), Candida (vermelho), Lesão (azul) e Vaginose (verde); B. Índices Chao1, Simpson e Sannon utilizados para estimar a diversidade microbiana..... 78
- Figura 2** Diversidade das espécies bacterianas encontradas. Análise de coordenadas principais (PCoA), realizada com base em métricas de distância filogenéticas (UniFrac) para a demonstração da diversidade beta, ilustrando um

	agrupamento distinto dentro do grupo Vaginose. Normal: Amarelo; Candida: Vermelho; Vaginose: verde e Lesão: Azul.....	79
Figura 3	Abundância relativa das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) encontradas, a nível de Filo entre os grupos de estudo.....	80
Figura 4	Abundância relativa de OTUs, a nível de Gênero entre os grupos de estudo. A. Com a representatividade do gênero <i>Lactobacillus</i> . B. Sem a representatividade do gênero <i>Lactobacillus</i> . A representação entre os sítios ectocérvice (laranjado), Endocérvice (verde) e Ectocérvice (azul).....	81
S1 Fig.	Sequências nucleotídicas dos <i>Primers Forward</i> e <i>Reverse</i> utilizadas para a construção das bibliotecas de <i>Amplicons</i> do Gene 16S rRNA	94
ANEXO 4 - Perfis eletroforéticos referentes às ampliações para o Diagnóstico Molecular de patógenos		
Figura 5	Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), evidenciando um fragmento de 450 pb, utilizando-se os <i>primers</i> MY09/MY11 (MANOS et al., 1989). M: Marcador de peso molecular 100 pb <i>Invitrogen Life Technologies</i> ; Amostras 134-140; C+: Controle positivo; Br: Branco.....	132
Figura 6	Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), evidenciando um fragmento de 150 pb, utilizando-se os <i>primers</i> GP5/GP6 (EVANDER et al., 1992). M: Marcador de peso molecular 100 pb <i>Invitrogen Life Technologies</i> ; Amostras 28-36; C+: Controle positivo; Br: Branco.....	132
Figura 7	Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), evidenciando um fragmento de 241 pb, utilizando-se dos <i>primers</i> KL1/KL2 (MAHONY et al., 1993). M: Marcador de peso molecular 100 pb <i>Invitrogen Life Technologies</i> ; Amostras 109-117; C+: Controle positivo; Br: Branco.....	133
Figura 8	Figura 8: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), evidenciando um fragmento de 112 pb, utilizando-se dos <i>primers</i> BTUB9/BTUB2 (MADICO et al., 1998). M: Marcador de peso molecular 100 pb <i>Invitrogen Life Technologies</i> ; Amostras 91-99; C+: Controle positivo; Br: Branco.....	133
Figura 9	Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), evidenciando um fragmento de 132 pb, utilizando-se dos <i>primers</i> PapF/PapR (WHILEY et al., 2004). M: Marcador de peso molecular 100 pb <i>Invitrogen Life Technologies</i> ; Amostras 19-27; C+: Controle positivo; Br: Branco.....	133

ANEXO 5 - Perfis eletroforéticos referentes às ampliações para da montagem de bibliotecas das regiões V1-V2 do gene 16S rRNA

Figura 10 Figura 10: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento \cong 480 pb, utilizando-se os *primers* A1MF-A10MF/P11MR e P12MR, antes da padronização da PCR. M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Br: Branco.. 134

Figura 11 Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento \cong 480 pb, utilizando-se os *primers* A1MF-A10MF/P11MR e P12MR, após padronização de PCR. M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Br: Branco..... 135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a detecção molecular do HPV.....	42
Tabela 2	Condições da amplificação para o diagnóstico do HPV.....	43
Tabela 3	Condições para a Reação de sequenciamento.....	44
Tabela 4	Sequências dos <i>primers</i> utilizados para o diagnóstico molecular de <i>C. trachomatis</i>	45
Tabela 5	Condições da amplificação para o diagnóstico de <i>C. trachomatis</i>	45
Tabela 6	Sequências dos <i>primers</i> utilizados para o diagnóstico molecular do <i>T. vaginalis</i>	46
Tabela 7	Condições da amplificação para diagnóstico de <i>T. vaginalis</i>	46
Tabela 8	Sequências dos <i>primers</i> utilizados para o diagnóstico molecular do <i>N. gonorrhoeae</i>	47
Tabela 9	Condições da amplificação para o diagnóstico de <i>N. gonorrhoeae</i>	47
Tabela 10	Condições de amplificação para a construção das bibliotecas de <i>amplicons</i>	51

ARTIGO 1

Tabela 1	Relationship between distribution of the studied risk factors and normal or abnormal cytology status.....	61
Tabela 2	Distribution of Human Papillomavirus (HPV) genotypes and coinfections with <i>Trichomonas vaginalis</i> (TV) and <i>Chlamydia trachomatis</i> (CT).....	62
Tabela 3	Association between histopathology and Human Papillomavirus (HPV) positivity.....	63

ARTIGO 2

Tabela 1	Diferenças na diversidade microbiana encontrada entre os grupos de estudo...	79
-----------------	--	----

ARTIGO 3

Tabela 1	Comparação das variáveis socioeconômicas entre os grupos de estudo Normal, Candida, Vaginose e Lesão.....	102
Tabela 2	Comparação de variáveis relativas ao comportamento sexual e pH entre os grupos de estudo.....	103

Tabela 3	Comparação das variáveis clínicas qualitativas entre os grupos de estudo.....	105
Tabela 4	Comparação das variáveis referentes ao diagnóstico molecular entre os grupos de estudo.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Amazonas
CAM	Centro de Apoio Multidisciplinar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMV	Citomegalovírus
CST	<i>Community State Types</i>
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CVV	Candidíase vulvovaginal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfato
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>Exo</i>	Exonuclease
FCECON-AM	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas
FUAM	Fundação Alfredo da Matta
H⁺	Íon Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HPV	Papilomavírus Humano
HSV-2	Herpesvírus Simples 2
HSIL	Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau, do inglês, <i>high squamous intra-epithelial lesions</i>
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
ISP	<i>Ion Sphere Particles</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KOH	Hidróxido de potássio
LAB-DM	Laboratório de Diagnóstico Molecular
LSIL	Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau, do inglês, <i>low squamous intra-epithelial lesions</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MgSO₄	Sulfato de Magnésio
mL	Mililitro
ng	nanograma

NIC	Neoplasia Intra-epitelial Cervical
nm	nanômetro
nM	nanomolar
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>
pb	Pares de base
PGM	<i>Ion Personal Genome Machine</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
Sap	Fosfatase Alcalina de Camarão, do inglês, <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SEMSA	Secretaria Municipal de Saúde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Solução Tampão: Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM
TEB	Solução Tampão: Tris Borato + EDTA
Tm	Temperatura média de anelamento
TPK	Tampão de Lise: 900 µL de TE + 100 µL de Tween 20 a 20% + 20 µL de proteinase K a 10 mg/mL
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TV	<i>Trichomonas vaginalis</i>
U	Unidades
UBS	Unidade Básica de Saúde
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VB	Vaginose Bacteriana
WHO	World Health Organization
µg	Micrograma
µL	Microlitro
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Composição da microbiota vaginal.....	22
2.2 Desordens genitais e a composição da microbiota vaginal.....	25
2.2.1 Vaginose Bacteriana (VB).....	25
2.2.2 Candidose Vulvovaginal (CVV).....	27
2.2.3 Lesões pré-malignas e malignas do colo do útero.....	28
2.3 O HPV e o Câncer Cervical.....	30
2.3.1 Fatores de Risco para o desenvolvimento do Câncer Cervical.....	32
3 OBJETIVOS	35
3.1 Geral.....	36
3.2 Específicos.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Modelo de Estudo.....	38
4.2 Universo de Estudo	38
4.2.1 População de Referência.....	38
4.2.2 Critérios de Inclusão e/ou Exclusão	39
4.2.2.1 Critérios de Inclusão	39
4.2.2.2 Critérios de Exclusão	39
4.2.3 População de Estudo.....	39
4.3 Fluxo de Procedimentos	40
4.4 Coleta das Amostras e Extração do DNA genômico total	40
4.4.1 Citologia Oncótica.....	41
4.5 Quantificação e Padronização das Amostras Extraídas	42
4.6 Diagnóstico Molecular de Patógenos Sexualmente Transmissíveis	42
4.6.1 Diagnóstico Molecular do HPV (PCR).....	42
4.6.1.1 Purificação do Produto Amplificado	43
4.6.1.2 Reação de Sequenciamento	44
4.6.1.3 Precipitação do Produto da Reação de Sequenciamento e Sequenciamento.....	44
4.6.1.4 Análise das Sequências.....	44

4.6.2 Diagnóstico Molecular de <i>C. trachomatis</i> (PCR)	45
4.6.3 Diagnóstico Molecular do <i>T. vaginalis</i> (PCR)	45
4.6.4 Diagnóstico Molecular de <i>N. gonorrhoeae</i> (PCR)	47
4.6.5 Análise Estatística dos Resultados.....	48
4.7 Diversidade Bacteriana.....	48
4.7.1 Composição dos grupos de estudo.....	48
4.7.1.1 Microbiota vaginal autóctone (Normal).....	48
4.7.1.2 Microbiota vaginal apresentando candidose vulvovaginal (Candida).....	49
4.7.1.3 Microbiota vaginal apresentando vaginose bacteriana (Vaginose).....	49
4.7.1.4 Microbiota vaginal apresentando lesões pré-malignas e malignas do colo do útero (Lesão).....	50
4.7.2 Construção das Bibliotecas de <i>Amplicons</i>	50
4.7.2.1 Desenho dos <i>Primers</i>	50
4.7.2.2 Preparo das Bibliotecas de <i>Amplicons</i> (PCR)	51
4.7.2.3 Purificação e Quantificação das Bibliotecas de <i>Amplicons</i>	52
4.7.3 Sequenciamento	52
4.7.4 Análise Bioinformática	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
ARTIGO 1: Prevalence of Human Papillomavirus, <i>Chlamydia trachomatis</i> and <i>Trichomonas vaginalis</i> infections in Amazonian women with normal and abnormal cytology.....	57
ARTIGO 2: Vaginal microbiome diversity in Amazonian women.....	68
ARTIGO 3: Perfil de mulheres para um estudo de diversidade da microbiota vaginal.....	95
6 CONCLUSÕES.....	111
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
ANEXOS.....	128
APÊNDICES.....	135

1. INTRODUÇÃO



Diversos microrganismos habitam o corpo humano e se concentram em microambientes como o trato respiratório superior, gastrointestinal, vaginal, saliva e outros (DETHLEFSEN et al., 2007; TURNBAUGH et al., 2007). O termo microbioma foi primeiramente sugerido por Joshua Lederberg como “a comunidade ecológica de microrganismos comensais, simbiotes e patogênicos que literalmente compartilham o espaço do nosso corpo” (LERDERBERG; MACCRAY, 2001).

A microbiota indígena humana, compreendida por microrganismos que incluem bactérias, fungos, vírus e protozoários, desempenha funções essenciais que definem condições fisiológicas, imunitárias e nutricionais, as quais contribuem para a fisiologia do hospedeiro podendo existir variações interindividuais ou entre indivíduos de acordo com o sexo, a idade, dieta, fatores ambientais como o pH, a umidade, a temperatura, a disponibilidade de nutrientes, e estados patogênicos (BERG, 1996; CASH et al., 2006; DETHLEFSEN et al., 2007; ELOE-FADROSH & RASKO, 2013).

A microbiota indígena pode ser classificada em residente ou autóctone, constituída por microrganismos relativamente fixos, ou seja, que são encontrados com regularidade em determinada área, podendo sofrer ou não alterações, mas com capacidade de recompor-se; e transitória ou alóctone, constituída por microrganismos provenientes do meio ambiente, que habitam a pele e mucosas, no entanto, sem se estabelecer de maneira permanente (MOURÃO et al., 2005).

Muito do que se entende hoje sobre a microbiota humana resulta de explorações utilizando métodos dependentes de cultivo, e assim, estima-se que, 20-60% dessa microbiota não seja cultivável levando a uma subestimação da diversidade ali encontrada (VERSTRAELEN, et al. 2004; ZHOU et al. 2004). Indiscutivelmente, o cultivo de microrganismos é essencial para a compreensão da fisiologia e propriedades fenotípicas desses organismos e, portanto, de valor inestimável para microbiologia clínica. No entanto, estudos realizados para avaliar a variação na composição da comunidade microbiana ou para explorar relações ecológicas e responder a questões epidemiológicas exigem métodos que forneçam informações detalhadas e aprofundadas sobre a diversidade microbiana (ZHOU et al., 2010).

Assim, o papel dessa microbiota nos processos de saúde e doença tem recebido maior atenção devido à possibilidade de quantificação e tipagem desses microrganismos, bem como do conhecimento de sua capacidade metabólica e funcional associada ao corpo humano através do uso de técnicas moleculares independentes de cultivo, o que torna viável o conhecimento mais aprofundado dessa diversidade microbiana, bem como, o desenvolvimento de mecanismos

para o entendimento dessa relação (GONZALEZ et al., 2011; HESS et al., 2011; ELOE-FADROSH; RASKO, 2013).

Nos últimos anos, a microbiota vem sendo muito explorada e gerando resultados concernentes à caracterização da diversidade, estrutura, função metabólica e de papéis ecológicos de uma grande variedade de ambientes, tais como o solo (ROESCH et al., 2007), o mar (HUBER et al., 2007; SOGIN et al., 2006), e o corpo humano, sob uma perspectiva médica, como é o caso do trato gastrointestinal (ANDERSSON et al., 2008), da cavidade oral (JENKINSON; LAMONT, 2005), da pele (FIERER et al., 2008) e da vagina (ZHOU et al., 2004; DRELL et al., 2013; FETTWEIS et al., 2014; MITRA et al., 2015).

De início, eram utilizadas técnicas que tinham como objetivo o sequenciamento do gene 16S rRNA (~1500 pb) para a caracterização dessas comunidades. Hoje, a maioria desses estudos têm utilizado métodos independentes de cultivo que se baseiam na análise de pequenas sequências hipervariáveis (~100-400 pb) deste gene através do *Next Generation Sequencing* (NGS), também chamado de sequenciamento de nova geração (MOREY et al., 2013).

Em resumo, o material genético é extraído a partir de amostras biológicas de interesse, fragmentos do gene 16S rRNA são amplificados utilizando-se *primers* que se anelam a regiões altamente conservadas desse gene e, em seguida, sequenciados em plataformas que oferecem flexibilidade, rapidez e baixo custo de aquisição para a quantidade de dados gerados, possibilitando assim, a remoção de vieses associados às técnicas de clonagem, por exemplo, e permitindo a análise de centenas, se não de milhares de amostras ao mesmo tempo (ELOE-FADROSH; RASKO, 2013; SANSCHARGRIN; YERGEAU, 2014).

Os métodos moleculares independentes de cultivo demonstram-se uma poderosa ferramenta para o isolamento de complexas sequências de DNA de microrganismos não cultiváveis, já que substitui a necessidade do cultivo desses organismos pela análise de ácidos nucléicos extraídos diretamente dessas amostras e viabiliza a investigação da diversidade bacteriana encontrada em diferentes habitats (REES et al., 2003; LING et al., 2010).

O estudo da diversidade microbiana humana através dessa abordagem abre caminhos para um futuro em que será possível indicar a resistência de um determinado microrganismo a uma droga em particular, pois embora a suscetibilidade e resistência a esta determinada droga sejam governadas por múltiplos componentes genéticos, alguns traços de resistência à droga são codificados por genes únicos e podem ser preditos com maior probabilidade através de sua detecção e sequenciamento. Também podem trazer uma compreensão mais aprofundada sobre a maneira como os microrganismos patogênicos causam as doenças, além de possibilitar a identificação de novas terapias que poderão envolver a manipulação da composição das

microbiotas ou genes humanos e produtos de genes que expressam substâncias com atividades regulatórias ou terapêuticas (GILL et al., 2006; FEERO et al., 2011; PROBIONOV, 2016).

Os resultados dos efeitos benéficos da microbiota endógena na saúde, tanto obstétrica quanto ginecológica, são numerosos, mas pouco elucidados. As comunidades microbianas exercem um papel importantíssimo para a manutenção da homeostase na vagina e prevenção da colonização por microrganismos patogênicos, no entanto, os mecanismos pelos quais exercem essa influência ainda não são tão bem definidos. Dessa forma, a utilização de métodos moleculares para a compreensão apropriada da microbiota vaginal, quanto a sua abundância relativa e variações, necessária para o reconhecimento desses microrganismos patogênicos potenciais e de processos fisiológicos de proteção, traz como desafio a necessidade de profissionais capacitados e de competências multidisciplinares nos campos da bioinformática, epidemiologia, ginecologia, imunologia, doenças infecciosas, ecologia microbiana e biologia molecular para a interpretação dos dados gerados e identificação de novas intervenções clínicas (FORNEY et al., 2010; BROTMAN et al., 2011; HUANG et al., 2014).

O Papilomavírus Humano (HPV) é vírus de transmissão por via sexual apontado como condição necessária para o desenvolvimento do câncer cervical, no entanto, estima-se que apenas 10% das mulheres por ele infectadas desenvolverá este tipo de câncer, demonstrando a existência de moduladores que agiriam como co-fatores deste vírus, inclusive a presença de outras infecções sexualmente transmissíveis (IARC, 2016).

Estudos voltados para o diagnóstico molecular de patógenos sexualmente transmissíveis, com ênfase no HPV, evidenciam um panorama nacional preocupante em que, o câncer cervical é o tipo de câncer mais incidente na região Norte, sem considerar os tumores de pele não-melanoma. Esta situação se diferencia para o restante do país em que o câncer cervical ocupa o segundo lugar nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, o terceiro lugar na região Sudeste e o quarto lugar na região Sul (INCA, 2015). Este quadro vem se repetindo há anos, levantando hipóteses sobre a existência de fatores relacionados a esta alta incidência na região Norte que fossem característicos da própria região e, até então, desconhecidos.

Sendo assim, no advento das técnicas moleculares independentes de cultivo este estudo, de caráter pioneiro no âmbito regional e nacional, acessou a diversidade microbiana vaginal de mulheres amazônicas em diferentes condições, com o intuito de caracterizá-la quanto à sua composição e diversidade a fim de elucidar a relação existente entre esta microbiota e o estado de saúde do trato genital feminino e possibilitar o futuro desenvolvimento de estratégias que busquem o envolvimento de novas terapias e diagnóstico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Composição da microbiota vaginal

A composição microbiológica da vagina ganhou destaque há mais de 100 anos quando Döderlein (1892) demonstrou pela primeira vez a presença de *Lactobacillus* sp. no conteúdo vaginal de mulheres saudáveis comparando à ausência destes mesmos microrganismos no conteúdo vaginal de mulheres que apresentavam endometrite pós-parto. Desde então, *Lactobacillus* sp. vem sendo apontada pelos mais diversos estudos, como a bactéria predominante na microflora vaginal normal, já que é capaz de produzir e liberar substâncias como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e as bacteriocinas¹. Além disso, essas bactérias liberam ácido lático como produto de seu metabolismo e, portanto, tornam-se responsáveis pela determinação do pH ácido nesta região (3,8 a 4,5), o que inibe o crescimento de vários microrganismos potencialmente nocivos. (SOBEL, 1999; ZHOU et al., 2010; SRINIVASAN et al., 2010; RAVEL et al., 2011; HICKEY et al., 2012; O'HANLON et al., 2013; GHARTEY et al., 2014).

Assim, na exacerbação de *Lactobacillus* sp., o pH vaginal diminui favorecendo a infecção por *Candida* sp. O pH vaginal aumenta ($\geq 4,5$) quando há uma diminuição de *Lactobacillus* sp. que propicia o crescimento de bactérias anaeróbias, o que caracteriza o quadro encontrado na Vaginose Bacteriana (VB) e contribui para o aumento do risco de infecção por patógenos sexualmente transmissíveis, como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o Papilomavírus Humano (HPV), o Herpesvírus Simples 2 (HSV-2) o Citomegalovírus (HCMV), *Trichomonas vaginalis* (TV), causador da tricomoníase, *Chlamydia trachomatis* (CT), causadora de uretrites, endometrites, salpingites, Doença Inflamatória Pélvica – DIP e até infertilidade e *Neisseria gonorrhoeae* (NG), causadora da gonorréia (WIESENFELD et al., 2003; KAUL et al., 2007; CONTI et al., 2009; DONATI et al., 2010; SRINIVASAN et al., 2010; PETROVA et al., 2013; ANAHTAR et al., 2015).

O equilíbrio do ecossistema da microbiota vaginal autóctone é mantido por complexas interações entre os produtos do metabolismo microbiano, o estado hormonal e a resposta imune do hospedeiro (GIRALDO et al., 2007). O maior enigma para os pesquisadores, nos últimos anos, é a determinação do estado autóctone da microbiota vaginal, ou seja, quanto de variação entre as comunidades microbianas vaginais pode ser aceito dentro de limites que não desencadeiem estados patogênicos (ZHOU et al., 2004; DRELL et al., 2013).

¹ As bacteriocinas agem como parte de um sistema antimicrobiano que pode inibir a replicação de vírus e o crescimento de bactérias e fungos, além de evitar o acesso de patógenos na vagina e cérvix e ainda estimular o sistema imune contra as bactérias que não são parte deste ecossistema.

A composição da microbiota vaginal difere muito entre as mulheres e pode ser modificada pelas alterações hormonais que ocorrem nas diferentes fases da vida. Antes da menarca, a microbiota vaginal pode ser considerada um misto de microrganismos intestinais com alguns tipos de lactobacilos. Após a puberdade, as condições para a proliferação de *Lactobacillus* sp. são providas pelo início da secreção de estrógeno e progesterona, que influenciam a proliferação do epitélio vaginal e produção de glicogênio e a citólise de células epiteliais com a liberação de glicogênio, respectivamente, o que caracteriza a fase reprodutiva da mulher (FETTWEIS et al., 2012; GARCÍA-VELASCO et al., 2017).

Alguns grupos de estudo têm relatado que as médias de pH vaginal em mulheres negras (4,7) e hispânicas (5) eram mais altas quando comparado às médias encontradas em mulheres caucasianas (4,2) e asiáticas (4,4), demonstrando que fatores do hospedeiro podem ter um papel importante na determinação da composição e estrutura de sua comunidade microbiana. Estes resultados na maioria das vezes estão associados à microbiota autóctone, indo de encontro com os parâmetros tradicionalmente convencionados e associados à saúde da microbiota vaginal (STEVENS-SIMONS et al., 1994; FISCELLA et al., 2004; RAVEL et al., 2011).

Fatores como idade, gravidez, tabagismo, atividade sexual, uso de duchas vaginais e uso de anticoncepcionais têm sido apontados como influenciadores da microbiota vaginal, já que se encontram associados a diminuição de *Lactobacillus* spp. (CHERPES et al., 2008; RYCKMAN et al., 2009; DIGIULIO et al., 2015).

De acordo com Ma et al. (2012), a microbiota vaginal autóctone pode ser definida como uma comunidade microbiana funcional que é adequadamente benéfica para o hospedeiro e não unicamente definida pela sua composição, sendo que esta funcionalidade poderia ser fornecida por vários tipos de comunidades microbianas vaginais e não apenas por um tipo pré-definido. Neste contexto, diferentes tipos de comunidades microbianas vaginais poderiam ser considerados saudáveis na ausência de sintomas, com ou sem a presença de uma ou várias espécies de lactobacilos comuns, apesar de apresentarem diferentes graus de predisposição a infecções por agentes patogênicos sexualmente transmissíveis.

Microrganismos como os dos gêneros *Atopobium*, *Streptococcus*, *Straphylococcus*, *Megasphaera* e *Leptotrichia* são capazes de realizar tanto fermentações homoláticas como fermentações heteroláticas² (RODRIGUEZ et al., 1999; ZHOU et al., 2004). Como a comunidade microbiana é altamente diversificada pode ocorrer uma redundância funcional

² A fermentação láctica é o processo metabólico no qual carboidratos são parcialmente oxidados, liberando energia, e tendo como produto final o ácido láctico (fermentação homolática) ou etanol, CO₂, acetato e glicerol além do ácido láctico (fermentação heterolática) (THOMAS et al., 1979).

permitindo que a função do ecossistema persista mesmo diante de algum tipo de perturbação (WARDLE, 2000). Assim, na ausência de sintomas, as comunidades bacterianas vaginais predominadas por esses microrganismos podem ser consideradas “saudáveis”, mesmo que sua composição se assemelhe àquelas associadas à VB sintomática.

Zhou et al. (2004) foram os primeiros pesquisadores que utilizaram métodos moleculares independentes de cultivo, a partir da clonagem de bibliotecas do gene 16S rRNA e, subsequente sequenciamento, para caracterizar a estrutura da comunidade microbiana vaginal a partir de amostras cervicais de cinco mulheres “saudáveis” em idade reprodutiva. Seus resultados mostraram que a presença de *Lactobacillus iners* no trato genital poderia ser muito maior do que se pensava e que a diversidade de *Lactobacillus* spp. poderia variar significativamente entre os indivíduos.

A microbiota autóctone vaginal foi explorada por Ravel et al. (2011) e evidenciou-se com a existência de cinco grandes *community state types* (CST) em estudo do tipo coorte que envolveu 396 mulheres norte-americanas de quatro etnias diferentes (asiática, branca, negra e hispânica). As CST I, II, III e V foram caracterizadas pelo domínio de *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii* respectivamente, tendo sido isoladas principalmente das mulheres brancas e asiáticas, enquanto que a CST IV, encontrada principalmente em mulheres negras e hispânicas, foi caracterizada com baixos índices de *Lactobacillus* sp. e, conseqüente, aumento da diversidade anaeróbica, incluindo gêneros como *Gardnerella*, *Pretovella*, *Corynebacterium*, *Atopobium*, *Megasphaera* e *Sneathia*. Os autores destacaram ainda que os dados obtidos são essenciais para a compreensão do papel da microbiota vaginal na redução do risco de contrair doenças e na identificação de fatores que determinam a suscetibilidade à doença.

Para García-Velasco et al. (2017), os resultados obtidos por Ravel et al. (2011) poderiam constituir o primeiro passo para a medicina personalizada, em que a diversidade microbiana entre indivíduos diferentes seria levada em consideração na avaliação de risco e no diagnóstico e tratamento de doenças. No entanto, na opinião de Gajer et al. (2012), entender os fatores que levam ao desenvolvimento e manutenção de uma comunidade microbiana vaginal específica e estável é extremamente necessário para o desenvolvimento de estratégias que promovam e mantenham a saúde reprodutiva.

Além disso, Smith et al. (2012) acompanharam dez mulheres porto-riquenhas por um período de 7 anos e caracterizaram seis tipos diferentes de CST predominadas por *G. vaginalis* ou *Lactobacillus* spp. e destacaram variações entre os tipos de CST ao longo do período de observação, confirmando em partes os resultados encontrados por Ravel et al. (2011).

Huang et al. (2014) confirmaram a existência de comunidades microbianas que diferem tanto na composição quanto na abundância relativa de espécies encontradas nos mais diversos estudos, também a variação significativa destas comunidades entre grupos raciais e étnicos, observação esta que se faz importante diante da influência que podem exercer na forma como as comunidades microbianas respondem a infecções ou a outros desequilíbrios, o que evidencia uma microbiota vaginal muito mais heterogênea e dinâmica do que até então acreditava-se, destacando os grandes avanços na compreensão da composição de comunidades microbianas vaginais nos últimos anos.

2.2 Desordens genitais e a diversidade da microbiota vaginal

2.2.1 Vaginose Bacteriana (VB)

A VB é considerada uma desordem vaginal polimicrobiana altamente prevalente em mulheres sexualmente ativas ou que se encontram na fase reprodutiva caracterizada pela depleção³ de *Lactobacillus* spp. e pelo crescimento de várias outras bactérias anaeróbicas incluindo espécies de *Mobiluncus*, *Prevotella*, *Mycoplasma* e *Atopobium*, tendo como bactéria predominante a *Gardnerella vaginalis*, o que leva ao aparecimento de corrimento vaginal com odor desagradável, o qual se acentua durante a menstruação ou após uma relação sexual, devido à presença do esperma de pH básico no ambiente vaginal (VERSTRAELEN et al., 2004; ATASHILI et al., 2008; PATTERSON et al., 2010; MUZNY et al., 2013; ONDERDONK et al., 2016).

O diagnóstico da VB geralmente se dá com base em sinais clínicos e pode ser realizado pelos critérios de Amsel et al. (1983) ou de Nugent (1991). Quando baseado em Amsel et al. (1983), é determinado pela ocorrência de, pelo menos, três dos quatro critérios descritos por Amsel et al. (1983), a saber: (1) o pH vaginal básico (>4,5), realizado com fita reagente específica, após cerca de um minuto em contato com o conteúdo vaginal; (2) a observação de corrimento com aspecto homogêneo ou microbolhoso, podendo apresentar cor branca, acinzentada ou amarelada; (3) a positividade para o Teste de Whiff, e (4) no citológico, a ausência de lactobacilos e a apresentação de células epiteliais vaginais com sua membrana recoberta por bactérias (“*clue cells*”), que aderem à membrana celular e tornam o seu contorno granuloso e impreciso (SILVA; LONGATTO, 2000). Quando baseado por Nugent (1991), é

³ Depleção: perda de elementos fundamentais ao microrganismo

determinado através da quantificação de lactobacilos e outros morfotipos: cocobacilos Gram-variáveis/Gram-negativos, característicos de *G. vaginalis* ou *Prevotella* spp., respectivamente e bacilos Gram-variáveis curtos que caracterizam *Mobiluncus* spp. No entanto, não é considerada uma doença sexualmente transmissível, mas uma facilitadora para a infecção de outros patógenos sexualmente transmissíveis.

Uma meta-análise composta por 23 publicações envolvendo um total de 30.739 mulheres realizada por Atashili et al. (2008), indicou uma associação entre VB não apenas com o aumento do risco de aquisição, mas também com o aumento do risco de transmissão do HIV.

Oakley et al. (2008) caracterizaram a microbiota vaginal de 34 amostras cervicais de mulheres americanas, sendo 21 VB+ e 13 VB-, utilizando clonagem e subsequente sequenciamento do gene 16S rRNA e demonstraram que a estrutura da comunidade bacteriana difere dramaticamente entre mulheres VB+, com predominância de *Prevotella* e VB-, onde houve predominância de *Lactobacillus* sp., além disso, o aumento da riqueza e diversidade⁴ foi associado à presença de VB.

Liu et al. (2013), através da clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA, caracterizaram a microbiota vaginal de dez mulheres VB+ e 10 mulheres VB- e demonstraram gêneros de bactérias altamente associados com a VB, como *Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Peptoniphilus*, *Dialister* e *Sneathia*. Nas mulheres VB- foram prevalentes as espécies *Lactobacillus iners* e *L. crispatus*.

A investigação da microbiota vaginal de 112 mulheres VB+, utilizando o pirosequenciamento das regiões V1-V3 do gene 16S rRNA por Muzny et al. (2013) evidenciou quatro tipos de comunidades bacterianas: (I) dominada por *Lactobacillus*; (II) dominada por *Lachnospiraceae*; (III) dominada por *Prevotella* e (IV) dominada por *Sneathia*.

Os microrganismos mais reportados na microbiota de mulheres portadoras de VB são a *G. vaginalis* (HARWICH et al., 2010), *A. vaginae* (BRADSHAW et al., 2010), Clostridiales [BVAB1] (Fredericks et al., 2005), *Megasphaera* [BVAB2] (Ling et al., 2010) e *Sneathia* [BVAB3] (Fredericks et al., 2007).

Vale ressaltar que fatores como o ciclo menstrual, o número elevado de parceiros sexuais, o uso de duchas vaginais, o tabagismo, a frequência do coito e até o uso de espermicidas

⁴ O termo Diversidade Biológica ou Biodiversidade refere-se tanto ao número (riqueza) de diferentes categorias biológicas quanto à abundância relativa (equitabilidade) dessas categorias e inclui variabilidade ao nível local (alfa diversidade), complementaridade biológica entre habitats (beta diversidade) e variabilidade entre paisagens (gama diversidade) ou seja inclui a totalidade dos recursos vivos, ou biológicos, e dos recursos genéticos, e seus componentes (DIAS, 2015, p.26).

podem aumentar o risco para este desequilíbrio (HELLBERG et al., 2000; NESS et al., 2003; BROTMAN et al., 2008; MITCHELL et al., 2012; GAJER et al., 2012).

2.2.2 Candidose Vulvovaginal (CVV)

A candidose vulvovaginal (CVV) é um distúrbio de ocorrência comum, que afeta mulheres entre 20 e 40 anos de idade causada pelo crescimento de *Candida* spp., tendo como causadora mais frequente a *Candida albicans*, que responde de 80 a 90% das infecções, não se excluindo a presença de outras espécies como a *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, que têm sido identificadas pela utilização de métodos avançados, nos últimos anos (JACKSON et al., 2005; VERMITSKY et al., 2008).

Vale ressaltar, porém, que a presença de *Candida* sp. no conteúdo vaginal não equivale necessariamente à existência de doença, já que 25% a 40% das mulheres que possuem cultura positiva para este microrganismo são completamente assintomáticas. Assim, o ponto de partida para o diagnóstico da CVV devem ser as manifestações clínicas, confirmadas pelos exames microscópicos (SIMÕES; GIRALDO, 1998; CORSELLO et al., 2003; CAVALCANTE et al., 2005).

As espécies de *Candida* são fungos comensais que habitam as mucosas vaginal, digestiva e respiratória e podem tornar-se patogênicos, sob determinadas condições que alteram o ambiente vaginal, como mudanças na acidez normal da vagina ou mudanças hormonais que fazem com que o ambiente passe a ser favorável ao seu desenvolvimento. Nesse contexto, estima-se que 75% das mulheres adultas apresentem a infecção pelo menos uma vez na vida (MARDH et al., 2002; ZIARRUSTA, 2002; SOBEL et al., 2007; CDC, 2017a).

A atividade sexual, o uso de antibióticos, a gravidez, o uso de contraceptivos orais, a terapia de reposição hormonal, o uso de corticoides, o diabetes mellitus não controlado, alteração dos níveis de glicose, especialmente em situações de hiperglicemia, e qualquer estado que possa elevar a quantidade de glicogênio no ambiente vaginal são apontados como fatores de risco múltiplo associados com a evolução da colonização para infecções sintomáticas, podendo envolver uma combinação entre a suscetibilidade e respostas inflamatórias do hospedeiro. Altos níveis de produção de hormônios femininos, especialmente a progesterona, aumentam a disponibilidade de glicogênio no ambiente vaginal, que serve como excelente fonte de carbono para o crescimento e a germinação das leveduras. Apesar disso, esses fatores não são identificados na maioria das pacientes que procuram atendimento apresentando CVV e o fato de haver grandes diferenças quanto às espécies de leveduras vaginais isoladas, de acordo

com a localização geográfica, pode ser levado em consideração como fator epidemiológico (SOBEL et al., 1999; ROSA; RUMEL, 2004; LOPES et al., 2004; GOSWAMI et al., 2006; SOBEL, 2007; FEUERSCHUETTE et al., 2010; CDC, 2017).

O conhecimento da microbiota vaginal colonizada por *Candida* spp. é pouco explorado e altamente controverso na literatura (BRADFORD et al., 2013). Os resultados obtidos por Zhou et al. (2009) através de estudo utilizando o sequenciamento completo do gene 16S r RNA em amostras cervicais de 42 mulheres que apresentavam recorrência de CVV e que não apresentavam recorrência de CVV não forneceram qualquer evidência de alteração ou composição incomum de comunidades bacterianas em sua comparação, sugerindo que o risco de infecções fúngicas recorrentes não está correlacionado com a composição da comunidade bacteriana vaginal. Além disso, seus resultados demonstraram que as mulheres com CVV recorrente não tiveram diminuição das proporções de *Lactobacillus* podendo indicar que não existe um papel de proteção desses microrganismos contra infecções por *Candida*.

Liu et al. (2013) foram os primeiros pesquisadores a utilizar o NGS, na verdade uma adaptação de protocolo descrita por Zhou et al. (2010), para determinar a estrutura da comunidade bacteriana vaginal antes e depois de tratamento em mulheres com CVV e chegaram à conclusão de que a microbiota vaginal colonizada por *Candida* spp. é muito mais complexa do que se imaginava e sugeriram que somente através de métodos que utilizem o NGS pode-se chegar a um perfil da comunidade microbiana exato, já que os resultados descritos até então, os quais utilizaram métodos dependentes de cultivo, são inconsistentes. Foram ainda surpreendidos com o fato de o perfil da comunidade microbiana em pacientes com CVV após o tratamento ter sido semelhante ao perfil microbiano de mulheres aparentemente saudáveis, indicando que a infecção por *Candida* pode criar um ambiente amigável e favorável para o aumento na abundância de *Lactobacillus* e, conseqüente, manutenção do equilíbrio normal da microbiota vaginal.

2.2.3 Lesões pré-malignas e malignas do colo do útero

As lesões intra-epiteliais escamosas (*squamous intra-epithelial lesions* – SIL) são lesões precursoras do câncer cervical e são classificadas, dependendo do grau de perda da diferenciação epitelial, em baixo grau (*low squamous intra-epithelial lesions* – LSIL) ou alto grau (*high squamous intra-epithelial lesions* – HSIL) e, geralmente, provocam alterações morfológicas características, detectáveis pela citologia dos raspados cérvico-vaginais e histopatologia (WOLSCHICK, 2007).

A infecção causada pelo HPV é considerada uma condição necessária tanto para o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas do colo do útero quanto na progressão destas lesões para o câncer cervical. No entanto, sendo o câncer uma doença multifatorial, fatores genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos podem estar envolvidos adicionalmente à infecção pelo HPV (PSYRRI; DIMAIO, 2008; INCA, 2015).

Neste contexto, a microbiota vaginal pode desempenhar um papel significativo no controle da infecção latente e na infecção pelo HPV. Estudos referentes à estrutura e composição das comunidades bacterianas da microbiota vaginal na presença do HPV podem revelar mecanismos pelos quais essa microbiota, bem como as comunidades ali encontradas ou até mesmo um conjunto de bactérias específicas cria condições para a infecção pelo HPV ou mesmo progressão de lesões para o câncer cervical (BROTMAN et al., 2014).

Um dos primeiros estudos que correlacionou a diversidade da microbiota vaginal com a presença de HPV em amostras cervicais de 68 mulheres coreanas (23 mulheres HPV+ e 45 mulheres HPV-) foi realizado por Lee et al. (2013) através do pirosequenciamento das regiões V2-V3 do gene 16S rRNA. Os autores demonstraram que as mulheres HPV+ apresentaram uma diversidade microbiana significativamente alta e com baixas proporções de *Lactobacillus* spp. quando comparadas às mulheres HPV-. Além disso, a análise permitiu a identificação a *Fusobacteria* e *Sneathia* spp. como bactérias associadas à infecção pelo HPV.

Brotman et al. (2014), demonstraram a relação entre a diversidade da microbiota vaginal e a infecção pelo HPV em um estudo que envolveu o acompanhamento de 32 mulheres durante 16 semanas, em que as amostras cervicais eram coletadas duas vezes por semana. Os autores classificaram as CST encontradas de acordo com a classificação descrita por Gajer et al. (2012) e associaram as CST IV (dominada por *Atopobium*, *Gardnerella*, *Streptococcus* e *Prevotella*) e III (dominada por *L. iners*) às mulheres HPV+, sugerindo que esses ambientes aumentam o risco de aquisição e/ou persistência do HPV.

Mitra et al. (2015), utilizando amostras cervicais coletadas a partir de 169 mulheres apresentando HSIL (92/169), LSIL (52/169), Câncer Cervical invasivo (5/169) e mulheres sem qualquer tipo de lesão (20/169) caracterizaram a microbiota vaginal e identificaram três CST, de acordo com a classificação descrita por Ravel et al., (2011) entre elas, a saber: CST I (dominada por *L. crispatus*), CST III (dominada por *L. iners*) e CST IV (dominada por *Atopobium*, *Gardnerella*, *Streptococcus* e *Prevotella*). Entre seus resultados, os autores apontaram *Sneathia sanguinegens*, *Peptostreptococcus anaerobius* e *Anaerococcus tetradius* como marcadores microbiológicos de HSIL, microrganismos esses que têm sido associados à infecção pelo HPV e VB. Além disso, sugeriram que a presença e prevalência de CST

específicas podem estar envolvidos nos mecanismos de progressão das SIL para o câncer cervical.

2.3 O HPV e o Câncer Cervical

O câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres do mundo inteiro, com incidência de 528 000 novos casos e mortalidade de 266 000 mulheres por ano, tem 70% dos novos casos ocorrendo nos países em desenvolvimento (IARC, 2016).

A estimativa de novos casos de câncer cervical para o Brasil em 2016 foi de 16.340, com um risco estimado de 16 casos a cada 100.000 mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer cervical é o mais incidente na região Norte (23/100.000). Nas regiões Centro-Oeste (20/100.000) e Nordeste (19/100.000) ocupa a segunda posição mais frequente e nas regiões Sudeste (11/100.000) e Sul (15/100.000) a terceira posição e quarta posições, respectivamente (INCA, 2015).

O HPV pertence ao gênero *Papillomavirus* e à família *Papillomaviridae*. São pequenos vírus não-envelopados com, aproximadamente, 55 nm de diâmetro, se apresentam com genoma circular constituído de dupla fita de DNA com cerca de 8.000 pares de base (pb) e funcionalmente dividido em três regiões: a região não codificadora (*long control region* – LCR), que contém o promotor p97 e sequências *enhancer* e *silencer* que regulam a replicação do DNA pelo controle de transcrição das sequências *Open Reading Frame* (ORF); a região precoce, do inglês, *early region* (E), que consiste das ORF E1, E2, E4, E5, E6 e E7, envolvidas na replicação viral; e a região tardia, do inglês, *late region* (L), que codifica as proteínas estruturais L1 e L2, responsáveis pela imunogenicidade do vírus e determinantes antigênicos gênero-específicos. Seu genoma é envolvido por uma capa proteica (capsídeo) onde se encontram as proteínas L1 e L2, organizadas em 72 capsômeros (BERNARD et al., 1994; BURD, 2003; DE VILLIERS et al., 2004; DOORBAR, 2005; MOODLY; LAIMINS, 2010).

Estudos epidemiológicos conduzidos ao redor do mundo descrevem a infecção pelo HPV em 85-93% dos casos de câncer cervical (DE SANJOSE et al., 2010).

Mais de 150 tipos de HPV já foram descritos, aproximadamente 40 tipos são associados diretamente com as infecções genitais e, pelo menos 20 estão diretamente associados ao câncer cervical (MUÑOZ et al., 2003; DE VILLIERS et al., 2004; DOORBAR, 2005; KIM et al., 2009).

De acordo com seu potencial oncogênico, são classificados como vírus de baixo risco (HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89), alto risco (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,

51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82) e provável alto risco (HPV-26, 53 e 66) (DE VILLIERS et al., 2004; MUÑOZ et al., 2006; DOORBAR et al., 2016). Os HPV 6 e 11, na maioria das vezes, provocam apenas infecção, causam a maioria das verrugas genitais, tanto em homens quanto em mulheres, e têm como resultado a morte celular. Já os tipos 16 e 18, são responsáveis por 57 e 16% de todos os casos de câncer cervical no mundo, respectivamente, seguido dos tipos 58, 33, 45, 31 52 e 35 (SMITH et al., 2007; BURK et al., 2009; IARC, 2012; GUAN et al., 2012).

A infecção pelo HPV ocorre através da entrada do vírus nas células basais do epitélio escamoso estratificado seguida por três eventos distintos: (1) o DNA viral é mantido na forma epissomal (circular e não integrado), estabelecendo uma infecção latente, o que geralmente ocorre em lesões benignas; (2) Haverá a conversão da infecção latente em produtiva e; (3) o DNA viral integra-se ao genoma da célula hospedeira, como se dá em lesões malignas, geralmente, associadas aos HPV de alto risco, tais como 16 e 18 (FIGURA 1) (RIVOIRE et al., 2006; WOLSCHICK et al., 2007; MOODLY; LAIMINS, 2010; DOORBAR et al., 2016).

Para integrar-se ao DNA da célula hospedeira é necessário que haja uma quebra no genoma viral, o que, geralmente ocorre nas regiões E1 e E2. Essas proteínas têm papel importante na manutenção do DNA viral em sua forma epissomal. O resultado dessa quebra é uma perda de função desses genes, acompanhada de uma desregulação da expressão dos genes E6 e E7 (RIVOIRE et al., 2006; WOLSCHICK et al., 2007). As proteínas codificadas pelos genes E6 e E7 do genoma do HPV, mostram-se diretamente relacionadas com a carcinogênese mediada pelo HPV. Apesar de não ser muito bem esclarecido, é possível que a ação ocorra através da interação de E6 com a proteína p53 (proteína supressora tumoral) e E7 com a proteína pRb (proteína do retinoblastoma), causando uma desregulação do ciclo celular, além de dar início a transformação e imortalização das células infectadas pelo HPV (MANDIC; VUJKOV, 2004; RIVOIRE et al., 2006; MOODLY; LAIMINS, 2010; DOORBAR et al., 2016).

Moodly e Laimins (2010) destacam que, mesmo que as proteínas E6 e E7 sejam necessárias para a transformação fenotípica, elas não são suficientes para direcionar uma transformação das células. É preciso que ocorram eventos oncogênicos adicionais para que a progressão maligna possa acontecer, tais como, a instabilidade genômica das células hospedeiras. Esse fato mostra-se consistente com o período de latência entre o início da infecção por HPV e o desenvolvimento do câncer. No entanto, proteínas E6 e E7 de HPV de alto risco induzem a instabilidade genômica em células normais, já que uma das principais características desses tipos de HPV é a indução à progressão maligna (WHITE et al., 1994; SCHIFFMAN et al., 2007).

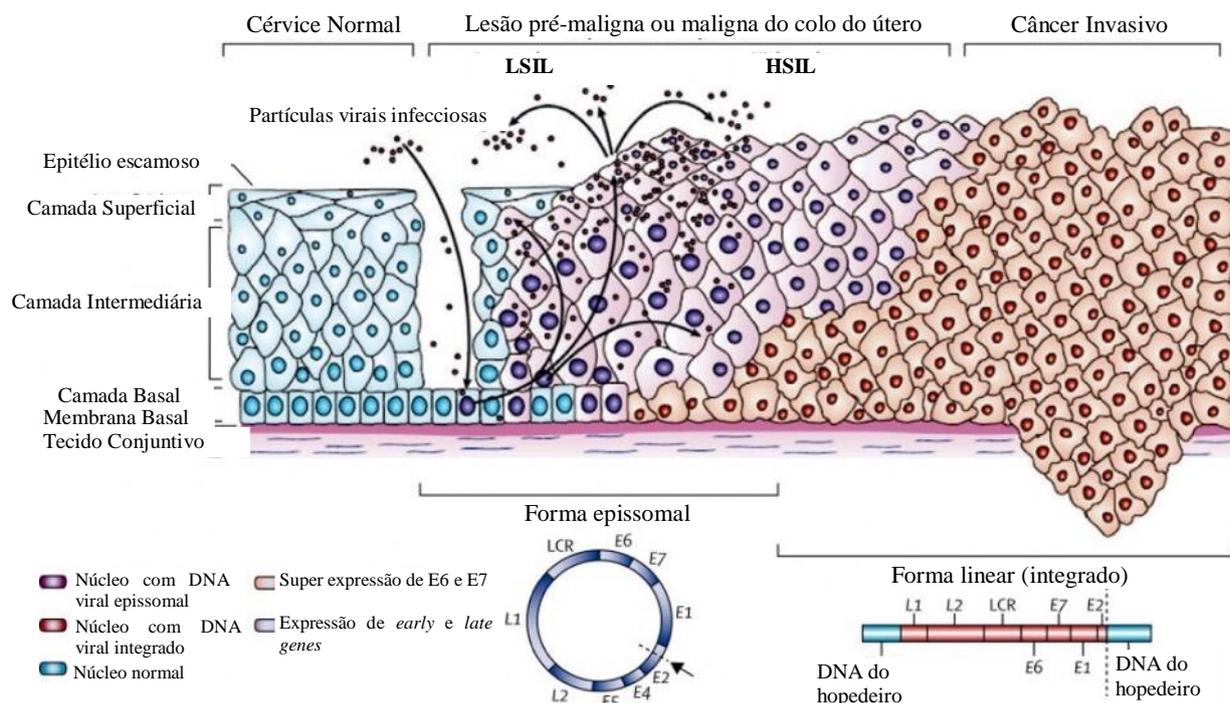


Figura 1: Progressão de lesões pré-malignas e malinas do colo do útero para câncer cervical. As células da camada basal se organizam acima do tecido conjuntivo da derme. O Papilomavírus Humano (HPV) é invade as as células basais por meio de micro abrasões no epitélio cervical. Após sua infecção, os early genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos e o DNA viral começa a ser replicado em sua forma epissomal (células com núcleos roxos). Nas camadas superiores do epitélio (camadas intermediária e superficial) o genoma viral é replicado ainda mais, e os late genes L1, L2 e E4 são expressos. L1 e L2 começam a encapsidação das partículas virais e iniciam novas infecções. Nas lesões do tipo LSIL começa a replicação produtiva. Uma parte das infecções por HPV de alto risco progridem para HSIL. A progressão das lesões não tratadas para o câncer invasivo está associada à integração do genoma do HPV no DNA do hospedeiro (núcleos vermelhos), com perda de E2 e, subsequente, super expressão dos oncogenes E6 e E7. LCR, região de controle comprida. Fonte: modificado de Woodman et al., 2007.

2.3.1 Fatores de Risco para o desenvolvimento do Câncer Cervical

Embora a infecção pelo HPV seja muito comum entre as mulheres sexualmente ativas, a maioria das infecções é transitória e, apenas algumas mulheres infectadas pelo vírus desenvolverão algum tipo SIL e, quando não tratadas, desenvolverão para o câncer cervical. Em outras palavras, a presença do HPV é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento dessas lesões, portanto, a existência de co-fatores é essencial para a progressão dessas lesões. (IARC, 2016).

Dessa forma, co-fatores ambientais, tais como o uso de contraceptivos orais, tabagismo, o número de parceiros sexuais, a multiparidade e a presença de outras infecções sexualmente transmissíveis (IST); co-fatores virais, os quais dizem respeito à infecção por tipos oncogênicos de HPV, co-infecção com outros tipos de HPV ou variantes destes; e co-fatores do hospedeiro

incluindo hormônios endógenos, fatores genéticos e relacionados à resposta imune têm sido associados e explorados ao longo dos anos por diversos estudos. E, neste contexto, a presença de patógenos causadores de outras IST, como herpes genital, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e o HIV ganha destaque nessa busca por respostas relacionadas à progressão de HSIL para o câncer cervical (MUÑOZ et al., 2000; SMITH et al., 2004; INCA, 2015).

O número de parceiros sexuais e a presença de outras IST são destacados como fatores circunstanciais e não causais, já que trariam uma exposição à infecção pelo HPV. Já o uso de contraceptivos orais poderia promover a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro e estimular a transcrição dos genes E6 e E7 envolvidos na carcinogênese, influenciando assim, a progressão da infecção. A multiparidade, por sua vez, é associada a manutenção prolongada da zona de transformação na ectocérvice ou mesmo a alterações hormonais como níveis aumentados de estrogênio e progesterona e o tabagismo, devido ao comprometimento de uma resposta imunológica local, já que pode ser encontrado no muco cervical e causar danos diretamente no DNA (BOSCH et al., 2002; CATELLSAGUÉ E MUÑOZ, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* – WHO, 2016), mais de 1 milhão de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) são adquiridas a cada dia, com estimativa de 357 milhões de novas infecções a cada ano, sendo as principais: Clamídia (131 milhões), Tricomoníase (143 milhões) Gonorréia (78 milhões) e Sífilis (5,6 milhões).

A *C. trachomatis* pertence ao gênero *Chlamydia* e à família *Chlamydiaceae*. É uma bactéria Gram-negativas de crescimento intracelular obrigatório e não apresenta a camada de peptidoglicano na parede celular, possui sensibilidade a determinados antibióticos e é desprovida de motilidade. Essas bactérias apresentam de sete a dez cópias de plasmídeos por célula bacteriana e uma cópia no gene codificador de maior proteína externa (MOMP) e possuem 19 sorotipos humanos identificados, os quais têm sido associados ao tracoma e conjuntivites (A-C), a endometrites (D-K) e linfogranuloma venéreo (L1-L3) (PAAVONEN; EGGERT-KRUSE, 1999; BARROS et al., 2007; AL-DARAJI; SMITH, 2009; ABDELSAMED et al., 2013).

Apesar de serem, geralmente, assintomáticas, as infecções do trato geniturinário por *C. trachomatis* são as principais causas de morbidade em mulheres sexualmente ativas e podem resultar em doença inflamatória pélvica (DIP), que é uma das principais causas de infertilidade, gravidez ectópica, dor pélvica crônica e infertilidade tubária, além de oftalmia neonatória, que pode levar a cegueira e pneumonia, já que mulheres grávidas infectadas podem transmitir essa

infecção aos bebês durante o parto. A alta prevalência deste patógeno tem sido relatada em mulheres jovens com idade entre 15 a 24 anos (GOLIJOW et al., 2005; CDC, 2017b).

A *N. gonorrhoea* pertence ao gênero *Neisseria* e à família *Neisseriaceae*. Caracteriza-se por ser uma bactéria Gram-negativa, com cerca de 0,6 a 1,0 µm de diâmetro, não-flagelada, formadora de esporos e anaeróbica facultativa. O gênero *Neisseria* abrange cerca de dez espécies. A *N. gonorrhoea* infecta o epitélio colunar endocervical com concomitante infecção uretral, causadora da gonorreia, uma IST do trato urogenital, transmitida por contato sexual ou perinatal, sendo assintomática, na maioria dos casos. Quando se manifesta, tal qual a *C. trachomatis*, pode levar a um quadro de doença inflamatória pélvica e resultar em problemas sérios como a infertilidade tubária, gravidez ectópica e dor pélvica crônica (PENNA, HAJJAR, BRAZ, 2000; WHILEY, TAPSALL, SLOOTS, 2006; PELLATI et al., 2008).

O *T. vaginalis* pertence ao gênero *Trichomonas* e à família *Trichomonadidae*. É um protozoário flagelado, caracterizado por sua motilidade ondulante, de natureza parasitária obrigatória devido à sua dependência por restos de tecido que contém ácidos nucleicos e lipídios presentes nas secreções do hospedeiro. Na maioria dos casos, a infecção é assintomática, mas pode manifestar-se através de corrimentos vaginais malcheirosos, de cor amarelada, espumoso e mucopurulento, acompanhado de prurido vulvar. A cérvix pode apresentar erosão e pontos hemorrágicos, conhecido como aspecto de morango. É um microrganismo que exibe tropismo por células escamosas do trato urogenital e, por isso, a infecção de órgãos vizinhos como a uretra, bexiga e endocérvice podem ocorrer além da vaginite, que é um dos sintomas predominantes (SOOD; KAPIL, 2008; PREETHI et al., 2011; CDC, 2017c).

Diante do exposto, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis* são agentes patogênicos de transmissão sexual associados à transmissão, persistência e carcinogênese induzida pelo HPV. Isso porque, a inflamação recorrente facilita a proliferação de células malignas e, quando as células com material genético viral integrado fogem dos mecanismos normais de controle do ciclo celular, desenvolve-se o câncer. Além disso, essas infecções são comprovadamente facilitadoras da infecção pelo HIV (GOSH et al., 2016; CDC, 2017a).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a diversidade microbiana do trato genital feminino em amostras cervicais apresentando quatro diferentes situações clínicas e citológicas: I. Microbiota vaginal autóctone; II. Microbiota vaginal apresentando Candidose Vulvovaginal (CVV); III. Microbiota vaginal apresentando vaginose bacteriana (VB); IV. Microbiota vaginal apresentando lesões pré-malignas do colo do útero.

3.2 Específicos

3.2.1 Caracterizar a população de estudo para a composição de quatro grupos bem definidos e caracterizados, de acordo com as situações a serem estudadas: I. Microbiota vaginal autóctone; II. Microbiota vaginal apresentando CVV; III. Microbiota vaginal apresentando VB; IV. Microbiota vaginal apresentando lesões pré-malignas do colo do útero;

3.2.2 Identificar fatores de risco potencialmente associados ao câncer cervical;

3.2.3 Diagnosticar, a nível molecular, a presença dos seguintes patógenos: HPV, TV, CT e NG;

3.2.4 Verificar a co-infecção dos patógenos sexualmente transmissíveis detectados;

3.2.5 Identificar o tipo de HPV encontrado nos diferentes grupos de estudo;

3.2.6 Construir quatro bibliotecas de *amplicons* de regiões do gene 16S rRNA a partir das amostras cervicais;

3.2.7 Estimar a diversidade microbiana total nas quatro situações a serem estudadas;

3.2.8 Identificar as espécies bacterianas encontradas nas quatro bibliotecas construídas;

3.2.9 Identificar filotipos potencialmente associados a características clínicas específicas observadas nas pacientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS



Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) conforme CAAE nº. 12240113.8.0000.5020.

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo do tipo transversal, que tem como objetivo investigar a diversidade microbiana do trato genital feminino em amostras cervicais apresentando quatro situações distintas: I. Microbiota vaginal autóctone; II. Microbiota vaginal apresentando vaginose bacteriana; III. Microbiota vaginal apresentando candidose vaginal; IV. Microbiota vaginal apresentando lesões pré-malignas e malignas do colo do útero.

4.2 Universo de estudo

4.2.1 População de Referência

O estudo teve como alvo mulheres residentes no estado do Amazonas (AM) há, pelo menos, dois anos, atendidas pela rede pública: Unidades Básicas de Saúde (UBS) Leonor Mendonça de Freitas, O 08 e Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON-AM), centro de referência na rede pública para mulheres que apresentam lesões pré-malignas e malignas do colo do útero, localizadas na cidade de Manaus (AM), na zona oeste.

Essas mulheres foram convidadas a participar do estudo, recebendo explicações quanto aos objetivos, benefícios, riscos da pesquisa, confidencialidade dos registros e, as que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) e responderam a um questionário padronizado (Apêndice B), através do qual foi possível traçar o perfil sócio-econômico, clínico e comportamental da população de estudo. A partir deste questionário, foram avaliadas informações como idade, procedência, estado civil, nível de escolaridade, renda familiar, primeira relação sexual, primeira gravidez, número de abortos, número de gestações através de parto normal ou cesáreo, uso de anticoncepcionais, hábito de fumar, assim também como o número de parceiros sexuais.

As mulheres recrutadas para o estudo tiveram ainda que obedecer aos critérios de inclusão e/ou exclusão.

4.2.2 Critérios de Inclusão e/ou Exclusão

4.2.2.1 Critérios de Inclusão

- Mulheres sexualmente ativas (Jovens Adultas);
- Mulheres com diagnóstico histopatológico de lesão pré-malignas ou malignas do colo do útero (LSIL, HSIL, Carcinoma invasor e Adenocarcinoma), no caso das mulheres que foram recrutadas na FCECON-AM;
- Mulheres com diagnóstico citológico sem alterações malignas, incluindo esfregaços citológicos normais e/ou inflamatórios, no caso das mulheres que foram recrutadas nas UBS.

4.2.2.2 Critérios de Exclusão

- Mulheres menopausadas;
- Mulheres que já fizeram conização ou histerectomia total;
- Mulheres em uso de antimicrobianos e/ou antifúngicos nos últimos quarenta e cinco (45) dias;
- Mulheres que utilizaram duchas vaginais higiênicas;
- Mulheres grávidas;
- Mulheres em terapia de reposição hormonal.

4.2.3 População de Estudo

Participaram deste estudo 187 mulheres atendidas pela rede pública de saúde, sendo 140 mulheres recrutadas nas UBS, as quais apresentavam citológicos normais e/ou inflamatório e 47 mulheres recrutadas na FCECON-AM, as quais apresentavam lesões pré-malignas ou malignas do colo do útero.

4.3 Fluxo de Procedimentos

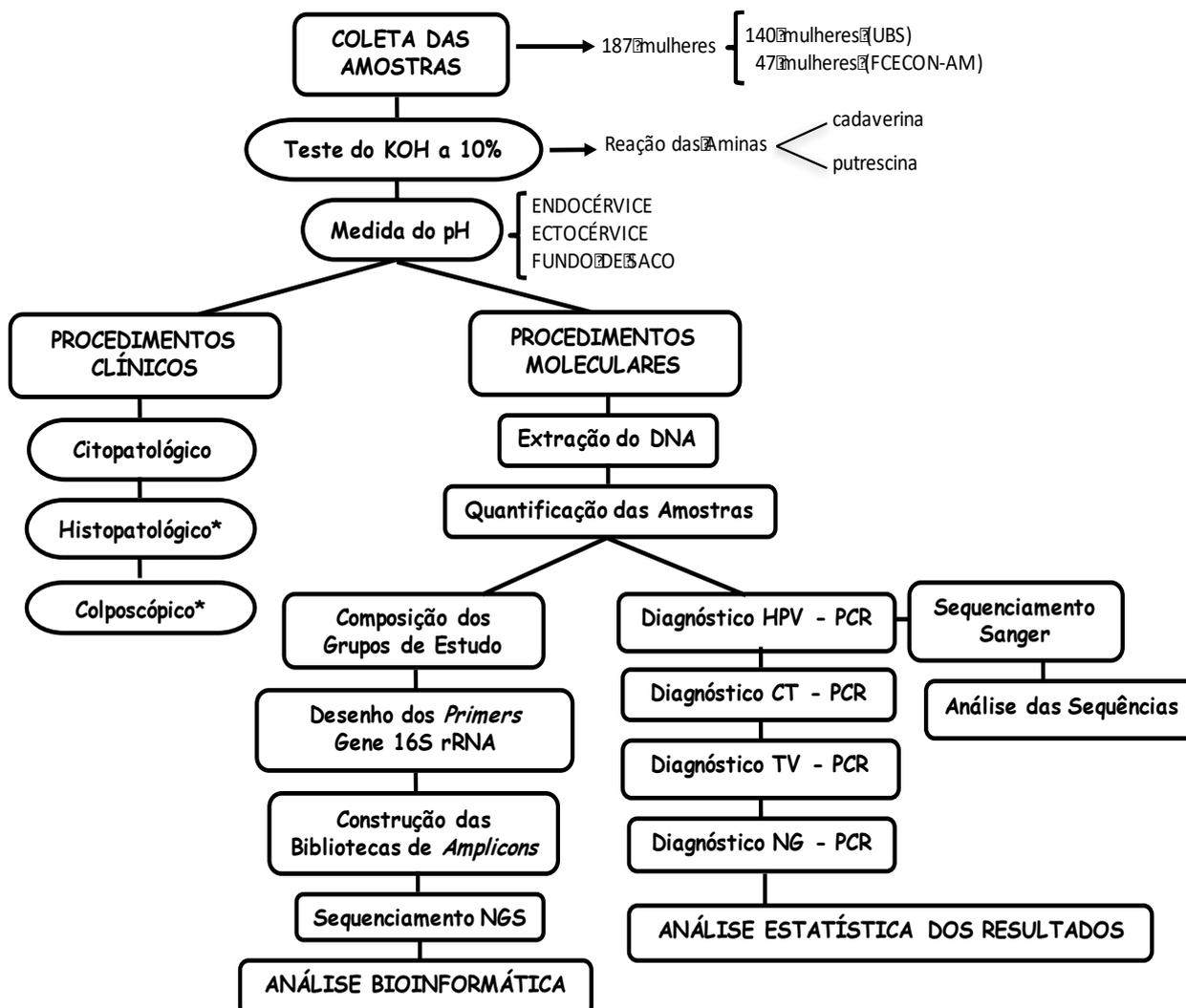


Figura 2: Fluxo de Procedimentos. Principais etapas para o desenvolvimento deste estudo (verde).

4.4 Coleta das Amostras e Extração do DNA genômico total

O material cervical referente à população estudada foi coletado a partir de 3 sítios diferentes: endocérvice, ectocérvice e fundo de saco posterior, em duplicata, no período de outubro de 2013 a abril de 2014.

Nas UBS, as coletas foram realizadas pelas enfermeiras responsáveis pelo procedimento dos exames preventivos. Para que não houvesse algum perigo de contaminação, as amostras destinadas ao estudo molecular foram coletadas antes da confecção das lâminas citológicas.

Na FCECON-AM, as coletas foram realizadas pessoalmente, sob a supervisão do médico responsável pelo atendimento das mulheres encaminhadas, com resultados dos exames citopatológico e histopatológico alterados. Essas mulheres foram acompanhadas desde o

momento de sua primeira consulta, onde eram submetidas à colposcopia, último exame confirmatório para a existência de lesões e, então abordadas para a participação no estudo. As coletas foram realizadas após 1 mês, quando do retorno para a realização da conização do colo do útero (procedimento cirúrgico em que um pedaço do órgão, em formato de cone, é retirado para a realização de uma biópsia que indicará se o tecido modificado foi excisado ou se outros tipos de tratamento serão necessários).

Todas as amostras cervicais foram coletadas com o auxílio de espéculos, escovas endocervicais descartáveis (*cyto-brush*) e espátulas de madeira, sendo transferidas para um microtubo descartável de 1,5 mL contendo 500 µL de solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM). No momento da coleta, foram realizados o teste do pH, com fitas medidoras (Merck), a partir da amostra ainda nas escovas endocervicais e o Teste de Whiff (ou Teste das aminas que consiste na reação das aminas, com a liberação de cadaverina e putrescina na presença de KOH a 10%, apresentando odor fétido semelhante a peixe podre) a partir da amostra ainda nos espéculos utilizados para as coletas (GIRALDO et al., 2007).

As amostras destinadas à análise molecular foram mantidas em banho de gelo e encaminhadas, no mesmo dia da coleta, ao Laboratório de Diagnóstico Molecular (LAB-DM), no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), da UFAM, sendo armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração do DNA, realizada de acordo com o protocolo do kit comercial *QIAamp® DNA Mini Kit* (Qiagen, Biotecnologia do Brasil LTDA), com algumas modificações (ANEXO 1).

4.4.1 Citologia Oncótica

As lâminas citológicas contendo material ecto- e endocervical, fixado em álcool 96° foram confeccionadas, em duplicata, pelas enfermeiras responsáveis, conforme padrão de funcionamento das UBS e transportadas, pessoalmente, ao Laboratório de Referência da Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA) Sebastião Ferreira Marinho, localizado na zona sul e responsável por toda a demanda dos laudos citopatológicos emitidos pela rede pública no município de Manaus. Dessa forma, havia um controle das lâminas pertencentes às participantes do estudo, até mesmo, quanto ao tempo de retorno dos resultados, normalmente em torno de 60 a 90 dias, o qual era reduzido para 30 dias. As lâminas citológicas foram lidas por dois profissionais diferentes para a emissão do laudo. Uma delas foi armazenada para a comparação de laudos.

4.5 Quantificação e Padronização das Amostras Extraídas

A quantificação do material genômico total foi realizada por espectrofotometria em equipamento *BioPhotometer® D30* (EPPENDORF), utilizando-se 2 µL de amostra. O DNA genômico total foi submetido a leituras nos comprimentos de onda de 260 nm, para avaliar a concentração de DNA, e 280 nm, para estimar a contaminação com proteínas. Amostras que apresentaram razão das leituras a 260/280 nm entre 1,5 e 2,0, demonstrando pureza adequada, foram consideradas (MOREY et al., 2013). Após a etapa de quantificação, todas as amostras foram padronizadas em concentração de 20 ng/µL, por meio de diluições. As soluções de trabalho (20 ng/µL) foram armazenadas em freezer a -20°C e as amostras em freezer a -80°C.

4.6 Diagnóstico Molecular de Patógenos Sexualmente Transmissíveis

4.6.1 Diagnóstico Molecular de HPV (PCR)

O diagnóstico molecular do HPV foi realizado através de *Nested-PCR* (EVANDER et al., 1992), que consiste em duas etapas de amplificação consecutivas tendo como alvo a região conservada L1 do genoma viral e utiliza os *primers* MY09/MY11 (MANOS et al., 1989) e GP5+/GP6+ (SNIJDERS et al., 1990) (TABELA 1).

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados para a detecção molecular do HPV

<i>PRIMERS</i>	SEQUÊNCIA (5'→3')	PRODUTO
MY09	CGTCCMAARGGAWACTGATC	450 pb
MY11	GCMCAGGGWCTATAAYAATGG	
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC	150pb
GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	

Posições nucleotídicas variáveis M=A ou C; R=A ou G, W=A ou T, Y=C ou T.

O sistema de reação utilizado na primeira amplificação (MY09/MY11) para um volume final de 25 µL foi composto de: 13,6 µL de água ultrapura; 2,5 µL de Tampão da Enzima 10X; 0,8 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µL de dNTP 10 mM; 2,5 µL do *primer forward* MY09 5 pmol; 2,5 µL do *primer reverse* MY11 5 pmol; 0,1 µL de *Platinum® Taq DNA Polymerase* 5U/µL e 2,5 µL da solução contendo a amostra de DNA.

Para a segunda etapa de amplificação (GP5+/GP6+) foram utilizados como amostra os produtos da PCR obtidos com os *primers* MY09/MY11, tendo sido manipulados em outro ambiente laboratorial.

O sistema de reação utilizado na segunda amplificação para um volume final de 25 μ L foi composto de: 15,1 μ L de água MilliQ; 2,5 μ L do Tampão da Enzima 10X; 0,8 μ L de MgCl₂ 50 mM; 0,5 μ L de dNTP 10 mM; 2,5 μ L do primer forward GP5+ 5 pmol; 2,5 μ L do primer reverse GP6+ 5 pmol; 0,1 μ L de *Platinum® Taq* DNA Polymerase 5U/ μ L; 1 μ L do produto de PCR da reação com MY09/MY11.

Para controle da reação, foi utilizado um branco de reagentes (com água Milli-Q no lugar da amostra) e um controle positivo com uma amostra conhecidamente positiva para HPV (sequenciada) do banco de amostras do Lab-DM, CAM, UFAM. As reações de PCR para detecção com MY09/MY11 e GP5+/GP6+ foram realizadas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Condições de amplificação para o diagnóstico de HPV

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	
Desnaturação	95°C	10 min	} 40 ciclos
Desnaturação	95°C	45 seg	
Anelamento	55°C	45 seg	
Extensão	72°C	40 seg	
Extensão Final	72°C	8 min	
Manutenção/ <i>Hold</i>	4°C	Indefinido	

Os produtos das PCR positivos para diagnóstico molecular de HPV foram sequenciados para a identificação do tipo de HPV encontrado.

4.6.1.1 Purificação do Produto Amplificado

Todas as amostras amplificadas foram purificadas com o sistema que utiliza as enzimas *Exo-Sap* (Exonuclease – *Exo* e Fosfatase Alcalina de Camarão - *Sap*) e que consiste na eliminação de substâncias não incorporadas durante a reação de amplificação tais como: sais, *primers* e dNTPs.

O sistema de purificação para um volume final de 16,5 μ L foi composto de: 15 μ L de produto de PCR (MY09/MY11 ou GP5+/GP6+); 0,5 μ L de Água Milli-Q; 0,4 μ L da Enzima *Exo* e 0,6 μ L da Enzima *Sap*.

As amostras foram incubadas em termociclador Veriti (*Life Technologies*), durante 30 minutos a 37°C e 20 minutos a 65°C, temperaturas ideais para a ação dessas enzimas.

4.6.1.2 Reação de Sequenciamento

O sistema da reação de sequenciamento para um volume final de 10 μL foi composto de: 0,5 μL de Big Dye; 2 μL de Tampão 5X; 0,64 μL *Primer* (podendo ser MY09 ou MY11 5 pmol ou GP5+ ou GP6+ 5 pmol); 4,86 μL de Água Milli-Q; 2 μL do produto da PCR purificado.

As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com as condições mostradas na Tabela 3 em termociclador Veriti (*Applied Biosystems, Life Technologies*).

Tabela 3: Condições para a Reação de Sequenciamento

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	
Desnaturação	94°C	5 min	} 25 ciclos
Desnaturação	96°C	15 seg	
Anelamento	50°C	15 seg	
Extensão	60°C	4 min	
Manutenção/Hold	4°C	Indefinido	

4.6.1.3 Precipitação do produto da reação de sequenciamento e sequenciamento

A precipitação do DNA foi realizada utilizando-se do protocolo com Isopropanol/Etanol (ANEXO 2). A ressuspensão das amostras foi feita utilizando-se Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems* P/N 4311320) (ANEXO 3). Em seguida, as sequências foram determinadas em analisador genético ABI 3500 (*Applied Biosystems*), conforme metodologia padrão do fabricante.

4.6.1.4 Análise das sequências

Os eletroferogramas foram conferidos em plataforma *BioEdit Version 7.2.5* (Hall, 1999). Os dados brutos foram enviados, via internet, para conversão dos eletroferogramas gerados após o sequenciamento em sequências, utilizando-se do programa PHRED, através do site: <www.bioinformatica.ufam.edu.br> (UFAM). O alinhamento das sequências foi realizado com as sequências depositadas no Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos – GenBank, utilizando-se o programa ClustalW. Para a confirmação e identificação do tipo do HPV, foi realizada uma comparação das amostras sequenciadas com as sequências depositadas, no *National Center for Biotechnology Information* – NCBI utilizando-se o programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) através do site: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Foram consideradas válidas as sequências com *e-value* menor que e^{-10} .

4.6.2 Diagnóstico Molecular de *C. trachomatis* (PCR)

Para o diagnóstico de CT, a reação de PCR foi realizada utilizando-se os *primers* KL1 e KL2 (MAHONY et al., 1993), que têm como alvo o DNA plasmidial da *C. trachomatis* (TABELA 4).

Tabela 4: Sequências dos *primers* utilizados para a diagnóstico molecular de *C. trachomatis*

<i>PRIMERS</i>	SEQÜÊNCIA (5'→3')	PRODUTO
KL1	TCCggAgCgAgTTACgAAgA	241 pb
KL2	AATCAATgCCCgggATTggT	

O sistema de reação utilizado para um volume final de 25 µL foi composto de: 13,4 µL de água Milli-Q; 2,5 µL de Tampão da Enzima 10X; 1 µL de MgSO₄ 50 mM; 0,5 µL de dNTP 10 mM; 2,5 µL do *primer forward* KL1 5 pmol; 2,5 µL do *primer reverse* KL2 5 pmol; 0,1 µL de *Platinum® Taq DNA Polymerase* 5U/µL e 2,5 µL da solução contendo a amostra de DNA.

Para controle da reação, foi utilizado um branco de reagentes (com água Milli-Q no lugar da amostra) e um controle positivo com uma amostra conhecida positiva para *C. trachomatis* (sequenciada) do banco de amostras do LAB-DM, CAM, UFAM.

As reações de PCR para detecção molecular de CT utilizando os *primers* KL1/KL2 foram realizadas de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5: Condições de amplificação para o diagnóstico da *C. trachomatis*

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	
Desnaturação	94°C	30 seg	} 40 ciclos
Desnaturação	94°C	30 seg	
Anelamento	64°C	30 seg	
Extensão	68°C	2 min	
Extensão Final	68°C	5 min	
Manutenção/Hold	4°C	Indefinido	

4.6.3 Diagnóstico Molecular do *T. vaginalis* (PCR)

Para o diagnóstico molecular do TV foi realizada uma PCR *touchdown* utilizando os *primers* BTUB9/BTUB2 (MADICO et al., 1998) que têm como alvo uma região bem conservada do gene beta-tubulina do *T. vaginalis* (TABELA 6).

O sistema de reação utilizado para um volume final de 25 µL foi composto de: 17,1 µL de água Milli-Q; 2,5 µL de Tampão da Enzima 10X; 0,8 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µL de dNTP

10 mM; 1 μ L do *primer forward* BTUB9 5 pmol; 1 μ L do *primer reverse* BTUB2 5 pmol; 0,1 μ L de *Platinum® Taq DNA Polymerase* 5U/ μ L e 2 μ L da solução contendo a amostra de DNA.

Tabela 6: Sequências dos *primers* utilizados para o diagnóstico molecular do *T. vaginalis*

<i>PRIMERS</i>	SEQUÊNCIA (5'→3')	PRODUTO
BTUB9	CATTgATAACGAAgCTCTTTACgAT	112 pb
BTUB2	GCATgTTgTgCCggACATAACCAT	

Para controle da reação, foi utilizado um branco de reagentes (com água Milli-Q no lugar da amostra) e um controle positivo com uma amostra conhecida positiva para *T. vaginalis* (sequenciada) do banco de amostras do LAB-DM, CAM, UFAM.

As PCR para a detecção do *T. vaginalis* utilizando os *primers* BTUB9/BTUB2 foram realizadas de acordo com as condições descritas na Tabela 7.

Tabela 7: Condições da amplificação para o diagnóstico de *T. vaginalis*

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	
Desnaturação	95°C	1 min 15 seg	} 4 ciclos
Desnaturação	95°C	45 seg	
Anelamento	62°C	45 seg	
Extensão	72°C	1 min	
Desnaturação	96°C	10 seg	} 4 ciclos
Anelamento	61°C	15 seg	
Extensão	60°C	1 min 30 seg	
Desnaturação	96°C	10 seg	} 4 ciclos
Anelamento	60°C	15 seg	
Extensão	60°C	2 min	
Desnaturação	96°C	10 seg	} 4 ciclos
Anelamento	59°C	15 seg	
Extensão	60°C	2 min	
Desnaturação	96°C	10 seg	} 4 ciclos
Anelamento	58°C	15 seg	
Extensão	60°C	2 min	
Desnaturação	96°C	10 seg	} 4 ciclos
Anelamento	57°C	15 seg	
Extensão	60°C	2 min	
Desnaturação	96°C	10 seg	} 4 ciclos
Anelamento	56°C	15 seg	
Extensão	60°C	2 min	
Desnaturação	96°C	10 seg	} 4 ciclos
Anelamento	55°C	15 seg	
Extensão	60°C	2 min	
Desnaturação	96°C	10 seg	} 4 ciclos
Anelamento	54°C	15 seg	
Extensão	60°C	2 min	
Desnaturação	96°C	10 seg	} 4 ciclos
Anelamento	53°C	15 seg	
Extensão	60°C	2 min	
Desnaturação	96°C	10 seg	} 20 ciclos
Anelamento	52°C	15 seg	
Extensão	60°C	2 min	
Manutenção/Hold	4°C	Indefinido	

4.6.4 Diagnóstico Molecular da *N. gonorrhoeae* (PCR)

Para o diagnóstico molecular da NG foi realizada uma PCR utilizando os *primers* PapF/PapR (WHILEY et al., 2004) que têm como alvo o pseudogene *porA* de *N. gonorrhoeae* (TABELA 8).

Tabela 8: Sequências dos *primers* utilizados para o diagnóstico molecular da *N. gonorrhoeae*

PRIMERS	SEQUÊNCIA (5'→3')	PRODUTO
PapF	CggTTTCCgTgCgTTACgA	132 pb
PapR	CTggTTTCATCTgATTACTTTCCA	

O sistema de reação utilizado para um volume final de 25 µL foi composto de: 13,6 µL de água Milli-Q; 2,5 µL de Tampão da Enzima 10X; 0,8 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µL de dNTP 10 mM; 2,5 µL do *primer forward* BTUB9 5 pmol; 2,5 µL do *primer reverse* BTUB2 5 pmol; 0,1 µL de *Platinum® Taq DNA Polymerase* 5U/µL e 2,5 µL da solução contendo a amostra de DNA.

Para controle da reação, foi utilizado um branco de reagentes (com água Milli-Q no lugar da amostra) e um controle positivo com uma amostra conhecidamente positiva para *N. gonorrhoeae*, cedida pela Fundação Alfredo da Matta (FUAM).

As reações de PCR para detecção com PapF/PapR foram realizadas de acordo com as condições descritas na Tabela 9.

Tabela 9: Condições de amplificação para o diagnóstico de *N. gonorrhoeae*

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	
Desnaturação	95°C	5 min	} 35 ciclos
Desnaturação	95°C	30 seg	
Anelamento	55°C	30 seg	
Extensão	72°C	30 seg	
Extensão Final	72°C	5 min	
Manutenção/ <i>Hold</i>	4°C	Indefinido	

Todas as reações para a detecção de patógenos sexualmente transmissíveis foram realizadas em termociclador Veriti (*Applied® Biosystems®, Life Technologies*). Os produtos das PCR para diagnóstico molecular de HPV, *C. trachomatis*, *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae* foram analisados em gel de agarose a 1,5% (MY09/MY11) e 2,5% (GP5+/GP6+); 2% (KL1/KL2); 2,5% (BTUB9/BTUB2) e 2% (PapF/PapR) (p/v), respectivamente, corado com 2 µL de brometo de etídeo [1 µg/µL], em tampão TEB 1X (Tris borato e EDTA), sob tensão elétrica de 80 a 100 Volts por, aproximadamente, 40 minutos. Foram aplicadas alíquotas com

volume final de 10 µL composto de: 5 µL do produto da PCR e 5 µL de tampão de amostra (Azul de bromofenol 0,5% e Glicerol 20%). Foi utilizado como marcador o *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*. Os géis foram visualizados por fluorescência sob luz Ultravioleta em transiluminador UVPTM e fotografados em sistema digital.

Os produtos amplificados foram armazenados a - 20°C.

4.6.5 Análise Estatística dos Resultados

Todas as análises estatísticas foram realizadas em parceria com a estatística Gleici Jane Sena Cruz da Secretaria Municipal de Saúde – SEMSA Manaus.

A análise da significância de diferença de proporções e posterior avaliação de existência ou não de associação entre as variáveis qualitativas foi realizada utilizando-se o Teste Qui-Quadrado de *Pearson* (χ^2) com simulação do p-valor e/ou o Teste Exato de *Fisher*, para os casos em que a frequência esperada fosse inferior a cinco ($p < 0,05$). Para as variáveis quantitativas foi aplicado o Teste *Kruskal-Wallis*.

O nível de significância utilizado nos testes foi de 5% com um intervalo de confiança de 95%. Todas as análises foram feitas através do software R 2.9.0.

4.7 Diversidade Bacteriana

4.7.1 Composição dos grupos de estudo

A composição dos grupos de estudo foi realizada após o término de coleta das 187 mulheres participantes desta pesquisa. Foram levados em consideração os resultados dos testes de pH e KOH, da citologia oncótica, da histopatologia e colposcopia. Estes dois últimos, realizados pelas mulheres que apresentavam lesões pré-malignas ou malignas do colo do útero.

4.7.1.1 Microbiota vaginal autóctone (Normal)

Para a composição do grupo Normal, foram consideradas aptas mulheres que tiveram resultado negativo para o Teste de Whiff, realizado durante a coleta e mulheres que apresentaram resultados citopatológicos sem evidências de patógenos. Foram excluídas as mulheres que relataram a ocorrência de lesões pré-malignas ou malignas do colo do útero anteriormente à participação nesta pesquisa.

4.7.1.2 Microbiota vaginal apresentando candidose vaginal (Candida)

Para a composição do grupo Candida foram consideradas aptas mulheres que relataram a presença de corrimento branco espesso e grumoso, acompanhado de coceira, confirmada pela observação durante o exame especular, às vezes em grande quantidade e aderido à parede vaginal e/ou ao colo; mulheres que apresentaram resultados negativos para o Teste de Whiff; e mulheres que apresentaram resultados citopatológicos com evidência de candidose vulvovaginal e excluindo a possibilidade da presença de lesões pré-malignas ou malignas do colo do útero, bem como de qualquer outro patógeno. Foram excluídas as mulheres que relataram a ocorrência de lesões pré-malignas ou malignas do colo útero, anteriormente à participação nesta pesquisa.

4.7.1.3 Microbiota vaginal apresentando Vaginose Bacteriana (Vaginose)

O diagnóstico da vaginose bacteriana pode ser determinado pela ocorrência de, pelo menos, três dos quatro critérios descritos por Amsel et al. (1983), a saber: (1) o pH vaginal básico com resultados acima de 4,5, realizado com fita reagente específica, após cerca de um minuto em contato com o conteúdo vaginal; (2) a observação de corrimento com aspecto homogêneo ou microbolhoso, podendo apresentar cor branca, acinzentada ou amarelada; (3) a positividade para o Teste de Whiff, e (4) no citológico, a ausência de lactobacilos e a apresentação de células epiteliais vaginais com sua membrana recoberta por bactérias (“*clue cells*”), que aderem à membrana celular e tornam o seu contorno granuloso e impreciso (SILVA; LONGATTO, 2000).

Assim, para a composição do grupo Vaginose, foram consideradas aptas mulheres que apresentaram pH vaginal acima de 5,0 com resultado positivo para o Teste de Whiff, ambos realizados durante a coleta; e mulheres que apresentaram resultados citopatológicos indicando a presença de bacilos supracitoplasmáticos e/ou sugestivo de *Gardnerella* e *Mobiluncus*, excluindo a possibilidade da presença de lesões pré-malignas ou malignas do colo do útero, bem como de, bem como de qualquer patógeno. Foram excluídas as mulheres que relataram a ocorrência de lesões pré-malignas ou malignas do colo útero, anteriormente à participação nesta pesquisa.

4.7.1.4 Microbiota vaginal apresentando lesões pré-malignas e malignas do colo do útero (Lesão)

As amostras com lesões pré-malignas e malignas do colo do útero, foram coletadas no FCECON-AM, após verificação de resultados citopatológicos e histopatológicos, confirmados pela colposcopia. Não foram excluídas as mulheres que relataram a presença de outras doenças sexualmente transmissíveis, devido à facilidade de concomitância por causa do estado em que se encontravam.

4.7.2 Construção das Bibliotecas de *Amplicons*

4.7.2.1 Desenho dos *Primers*

Os *primers* utilizados para a construção das bibliotecas de *amplicons* foram desenhados com base nas sequências nucleotídicas de regiões altamente conservadas do gene 16S rRNA bacteriano, adjacentes às regiões hipervariáveis V1 e V2, as quais têm sido exploradas nos mais diversos estudos de diversidade microbiana do trato genital feminino (ANUKAM et al., 2005; SPEAR et al., 2008; HMPC, 2012; DRELL et al., 2013; FETTWEIS et al., 2014; VERSTRAELEN et al., 2016). Para tanto, foram utilizadas as sequências dos *primers* universais 27F e 338R (MATILLA et al., 2012), que amplificam um fragmento de aproximadamente 330 pb. Tanto o *primer forward* quanto o *primer reverse* foram modificados pela adição de um PGM *sequencing adapter* A (5'CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG3') e um PGM *sequencing adapter* P1 (5'CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT3'), respectivamente e 20 *barcodes* diferentes (10 adicionados aos *primers forward* e 10 adicionados aos *primers reverse*), gerando 100 combinações de *barcodes* diferentes e tendo-se o cuidado de respeitar a leitura máxima da plataforma utilizada (~480 pb). Foram utilizados como critérios para a seleção dos *primers*, intercomplementaridade, intracomplementaridade, Temperatura média de anelamento (T_m) e percentual de GC das sequências após serem analisadas e editadas com o auxílio dos programas *Primer3*, *PerlPrimer* e *BioEdit* 7.5.0.3 (HALL, 1999; ROZEN; SKALETSKY, 2000; MARSHALL et al., 2000).

4.7.2.2 Preparo das Bibliotecas de *Amplicons* (PCR)

A padronização das reações para o preparo das bibliotecas de *amplicons* e subsequente construção das bibliotecas foram realizadas em termociclador Veriti (*Applied Biosystems, Life Technologies*).

O sistema de reação utilizado para um volume final de 30 μL foi composto de: 21,3 μL de água Milli-Q; 3 μL de Tampão da Enzima 10X; 0,9 μL de MgCl_2 50 mM; 0,6 μL de dNTP 10 mM; 1 μL do *primer forward* 5 pmol; 1 μL do *primer reverse* 5 pmol; 0,2 μL de *Platinum® Taq DNA Polymerase* 5U/ μL *Taq* polimerase 5U/ μL e 2 μL da solução contendo a amostra de DNA. Para controle da reação, foi utilizado um branco de reagentes (com água Milli-Q no lugar da amostra).

Para o início da construção das bibliotecas de *amplicons*, foi necessário realizar uma padronização das condições de PCR que seriam realizadas, que envolveram quantidade de ciclos da reação, temperatura de anelamento, tempo de anelamento e extensão, quantidade dos *primers* e amostras de DNA utilizados.

Após a padronização, as reações de PCR para a construção das bibliotecas de *amplicons* foram realizadas de acordo com as condições descritas na Tabela 10.

Tabela 10: Condições de amplificação para a construção das bibliotecas de *amplicons*

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	
Desnaturação	95°C	30 seg	
Desnaturação	94°C	15 seg	} 30 ciclos
Anelamento	60°C	30 seg	
Extensão	72°C	15 seg	
Extensão Final	72°C	5 min	
Manutenção/Hold	4°C	Indefinido	

Mesmo padronizadas, as condições precisavam ser modificadas todas as vezes que uma caixa nova de enzima era utilizada, ainda que esta enzima pertencesse ao mesmo fabricante e/ou ao mesmo lote.

Todas as reações foram realizadas em triplicata, de maneira individualizada, para o aumento de chances de representatividade da diversidade nos produtos obtidos e facilitação das repetições de PCR, quando necessário (caso não houvesse amplificação ou a evidência de anelamentos inespecíficos).

Os produtos das PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% (p/v) em solução, corado com 2 μL de brometo de etídeo [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$], em tampão TEB 1X (Tris borato e EDTA), sob tensão elétrica de 80 a 100 Ampères por, aproximadamente, 40 minutos. Foram aplicadas

alíquotas com volume final de 10 μL composto de: 5 μL do produto da PCR e 5 μL de tampão de amostra (Azul de bromofenol 0,5% e Glicerol 20%). Foi utilizado como marcador o *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*. Os géis foram visualizados por fluorescência sob luz Ultravioleta em transiluminador UVP™ e fotografados em sistema digital.

Os produtos amplificados foram armazenados a - 20°C.

4.7.2.3 Quantificação e Purificação das Bibliotecas de *Amplicons*

Os produtos de PCR foram quantificados, individualmente, por fluorimetria em *Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies)*, de acordo com as instruções do fabricante. A partir dos resultados obtidos, foram realizadas diluições individualizadas para que os produtos apresentassem concentrações iguais a 1 ng/ μL . Em seguida foi realizado um *pool* equimolar das bibliotecas a fim de serem purificadas, etapa que consistiu da eliminação de substâncias não incorporadas durante a reação de amplificação tais como: sais, *primers* e dNTPs e que se fez extremamente necessária frente à alta sensibilidade do sequenciamento em plataforma PGM, utilizando-se o kit *Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter™)*, de acordo com o manual do fabricante.

4.7.3 Sequenciamento

Foi realizada uma randomização das amostras que seriam sequenciadas utilizando o programa R (2015), com o intuito de se obter uma representatividade através da igual distribuição das amostras, caso houvesse algum tipo de perda durante os procedimentos realizados.

Algumas amostras foram excluídas por não apresentarem quantidade suficiente de material para a construção das bibliotecas de *amplicons* do gene 16S rRNA, devido ao árduo processo realizado em prol da padronização das PCR.

O preparo do *template* e amplificação clonal foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante: “*Prepare Template-Positive Ion PGM Template OT2 400 Ion Sphere Particles (ISPs)*”. Nesta etapa, foram utilizados reagentes e materiais dos kits “*Ion PGM Template OT2 Reagents 400*”, “*Ion PGM Template OT2 Solutions 400*”, “*Ion PGM Template OT2 Reactions 400*” e “*Ion PGM Template OT2 Supplies 400*”. As reações de PCR clonal foram realizadas no equipamento *Ion OneTouch 2 (Life Technologies)*.

A amplificação clonal ou PCR de emulsão tem por objetivo gerar muitas cópias de cada *amplicon* da biblioteca. Nesse processo, cada fragmento é amplificado em microreatores formados por emulsão em óleo, os quais contêm os reagentes de PCR e pequenas esferas (ISPs) cobertas com o *primer* P1 (sequência complementar ao adaptador P1). Esta etapa consiste na fixação dos clones no *template* às *beads* (FIGURA 3).

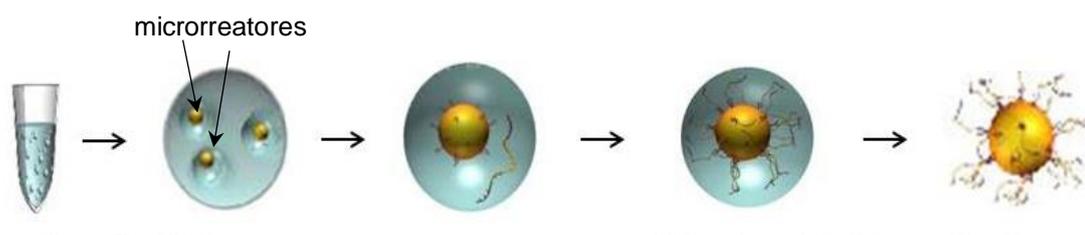


Figura 3: Esquema demonstrativo da *PCR clonal ou de emulsão*, em que os fragmentos são ligados às *IonSpheres* (pequenas esferas) através de *primers* P1 (sequências complementares ao adaptador P1), que se encontra na superfície das esferas. Um único fragmento se liga a uma determinada esfera. Essas esferas são capturadas individualmente em gotículas oleosas (microreatores) onde a PCR em emulsão ocorre. Nesse processo, são gerados milhares de cópias de cada fragmento. Fonte: MARDIS, 2008.

Ao final da PCR em emulsão, o produto foi lavado, para ser usado no enriquecimento do *template*, de acordo com o protocolo do fabricante: “*Enrich the Template-Positive Ion PGM Template OT2 400 Ion Sphere Particles (ISPs)*”. O enriquecimento foi realizado no equipamento *Ion OneTouch ES (Life Technologies)*, utilizando-se os reagentes e materiais dos kits “*Ion PGM Template OT2 Solutions 400*”, “*Ion PGM Template OT2 Supplies 400*” e “*Ion PGM Enrichment Beads*”. Nessa etapa, as esferas que incorporaram fragmentos durante a PCR clonal hibridizam com *beads* magnéticas e, durante a lavagem, são eliminadas as esferas que não incorporaram qualquer fragmento. Após a etapa de enriquecimento, as esferas hibridizadas foram utilizadas para o carregamento do chip *Ion 318 v2* a fim de serem sequenciadas utilizando a plataforma *Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System (Life Technologies)*, utilizando-se os reagentes e materiais dos kits “*Ion PGM Sequencing Reagents 400*”, “*Ion PGM Sequencing Solutions 400*” e “*Ion PGM Sequencing Supplies 400*”.

Uma vez feito o carregamento do chip, as esferas enriquecidas foram incorporadas, individualmente, em cada um dos milhares de poços que compõem o chip. No sequenciamento PGM, a reação de polimerização gera um próton (H^+) que altera o pH do meio. Essa alteração é detectada diretamente por um transistor, que a converte em um sinal elétrico. Cada poço tem um sensor de pH e a detecção é dada por fluxos contínuos das bases, onde a injeção de cada

uma se dá individualmente seguida de uma lavagem (VARUZZA, 2016), conforme observado na Figura 4.

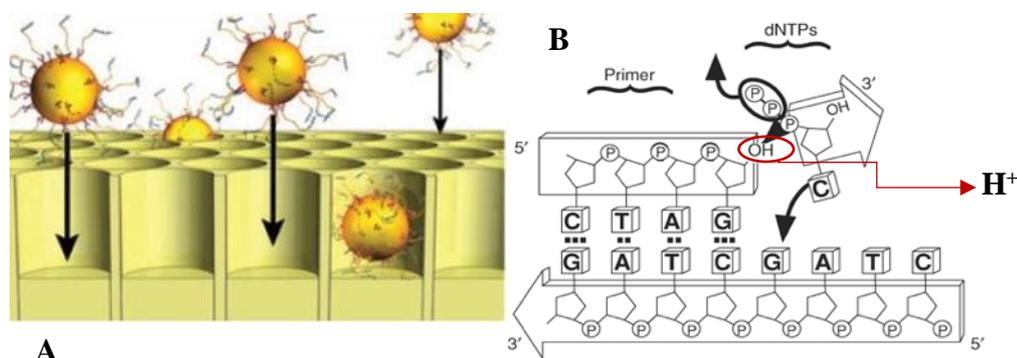


Figura 4: Sequenciamento em Ion Torrent. A. Esquema demonstrando a incorporação de uma única *ISP* para cada poço do Ion Chip 318 v2. **B.** Durante o sequenciamento, a *Taq* polimerase incorpora uma base sendo então liberado um fosfato e um H^+ , o qual é detectado por um sensor de pH que transforma a mudança de pH em um sinal elétrico. Fonte: MARDIS, 2008; VARUZZA, 2016.

4.7.4 Análise Bioinformática

A análise bioinformática foi realizada em parceria com a Dra. Tainá Raiol Alencar da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ Brasília.

Os dados gerados a partir do sequenciamento foram processados pelo *software Torrent Suite* (plataforma PGM) e armazenados em formato BAM, sendo convertidos em formato FASTAq, contendo as sequências brutas e seus respectivos valores de qualidade. Em seguida, essas sequências foram avaliadas quanto à sua qualidade e presença de adaptadores por meio do programa FastQC v0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e sequências com média de valores de qualidade PHRED inferior a 20 foram removidas com o programa PRINSEQ (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). Scripts na linguagem de programação *Perl* foram desenvolvidos para a separação das sequências por amostra e remoção de *barcodes*. A identificação destes foi feita admitindo-se até um erro de nucleotídeo na comparação com as sequências.

Para a análise de diversidade foi utilizado o software QIIME v1.8 (CAPORASO et al., 2010a), que consiste em um pacote de programas para a análise comparativa de comunidades microbiológicas, tendo como principais objetivos a classificação de espécies, análise filogenética e de biodiversidade, análise funcional e estatística. As sequências que atenderam aos critérios de classificação e qualidade foram alinhadas contra as sequências disponíveis no banco de dados do GreenGenes pelo método PyNAST (CAPORASO et al., 2010b), e as sequências válidas foram classificadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs),

assumindo-se 97% como valor limite de similaridade pelo método UCLUST. Em seguida, os dados obtidos foram então submetidos à análise de diversidade alfa pelos índices de Shannon, Simpson e Chao1. Curvas de rarefação foram geradas para avaliação da riqueza de espécies por meio de amostragens de igual tamanho de cada amostra e verificação do aumento no número de UTOs únicas por condição experimental. Além disso, medidas de diversidade beta foram calculadas usando a técnica de Jackknife, que consiste na reamostragem de um subconjunto de dados de profundidade referente a 75% da menor amostra, sendo produzidas 10 reamostragens (repetições) para cada amostra. Em seguida, foram calculadas as matrizes de distância para cada conjunto de dados e utilizadas como base para o agrupamento hierárquico com UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e componentes de PCoA (*Principal Coordinates Analysis*), para avaliar o grau de variação entre as repetições, exibida por elipses de confiança. O pacote do R phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013) foi utilizado para as análises complementares em diferentes níveis taxonômicos e representação gráfica dos resultados obtidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este tópico é apresentado em forma de artigos científicos relacionados ao tema da Tese.

ARTIGO 1: “Prevalence of Human Papillomavirus, *Chlamydia trachomatis* and *Trichomonas vaginalis* infections in Amazonian women with normal and abnormal cytology”. Este artigo foi publicado na Revista **Genetics and Molecular Research** e explora os 3º, 4º e 5º objetivos específicos desta Tese.



Prevalence of human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, and *Trichomonas vaginalis* infections in Amazonian women with normal and abnormal cytology

E. Costa-Lira^{1,2}, A.H.V.L. Jacinto², L.M. Silva³, P.F.R. Napoleão³,
R.A.A. Barbosa-Filho³, G.J.S. Cruz⁵, S. Astolfi-Filho⁴ and
C.M. Borborema-Santos³

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,
Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

³Laboratório de Diagnóstico Molecular, Centro de Apoio Multidisciplinar,
Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

⁴Laboratório Tecnologias do DNA, Centro de Apoio Multidisciplinar,
Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

⁵Departamento de Planejamento, Secretaria Municipal de Saúde de Manaus,
Manaus, AM, Brasil

Corresponding author: E. Costa-Lira

E-mail: costa_eve@yahoo.com.br

Genet. Mol. Res. 16 (2): gmr16029626

Received January 25, 2017

Accepted March 13, 2017

Published April 28, 2017

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16029626>

Copyright © 2017 The Authors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution ShareAlike (CC BY-SA) 4.0 License.

ABSTRACT. Sexually transmitted infections are an important cause of morbidity among sexually active women worldwide, and have been implicated as cofactors in the pathogenesis of cervical cancer. We investigated the prevalence of human papillomavirus (HPV), *Chlamydia trachomatis* (CT), and *Trichomonas vaginalis* (TV), and

accessed the diversity of HPV in women with normal and abnormal cytology in Manaus, Brazil. We used polymerase chain reaction and HPV genotyping by direct sequencing. The chi-square test was used to calculate the absolute and relative frequencies of the categorical variables, and Fisher's test was used when $P < 0.05$. The level of significance was set at 5%. All statistical analyses were performed using R 2.9.0. There were statistically significant differences in age ($P = 0.0395$), education level ($P = 0.0131$), sexual partners ($P = 0.0211$), condom use ($P = 0.0039$), marital status ($P < 0.0001$), and pregnancy ($P = 0.0003$) between the normal and abnormal groups. HPV DNA was found in 36.56 and 93.88% of subjects in the normal and abnormal groups, respectively. A total of 19 genotypes were detected; HPV16 was the most common, followed by HPV58. The percentages of TV and CT DNA were 18.04 and 9.02% in the normal group, respectively. The percentages of HPV/TV and HPV/CT coinfection were 12.5% each in women with normal cytology. These findings improve our understanding of HPV, CT, and TV, and the distribution of HPV types, which may be relevant to vaccination strategies for protecting women from the north of Brazil from cervical cancers and precancerous lesions.

Key words: Human papillomavirus; *Chlamydia trachomatis*; *Trichomonas vaginalis*; Polymerase chain reaction; Prevalence

INTRODUCTION

Cervical cancer is the second most common cancer in women in developed countries, and it is estimated that there are 530,000 new cases each year [WHO (World Health Organization), 2016]. In Brazil, it is estimated that there were 16,340 new cases in 2016, with a risk factor of 15 cases per 100,000 women. Excluding non-melanoma skin tumors, cervical cancer is the most prevalent cancer in the north region of Brazil, unlike in other Brazilian regions, with an incidence of 23.97/100,000 women [INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), 2015]. Persistent infection with human papillomavirus (HPV) is the principal cause of cervical cancer and its precursor, cervical intraepithelial neoplasia.

According to their oncogenic potential, the different types of HPV are classified as low-risk viruses (LR-HPV: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, and 89), high-risk viruses (HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, and 82), and probably high-risk viruses (pHR-HPV: 26, 53, and 66) (de Villiers et al., 2004; Muñoz et al., 2006). Both oncogenic and non-oncogenic types of HPV can cause low- and high-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL and HSIL, respectively), and may or may not lead to the development of cervical cancer. HPV16 and 18, however, are responsible for 50 and 20% of all cases of cervical cancer worldwide, respectively (Burk et al., 2009). Although they are very common among young women, the majority of HPV infections are transient, and only a small percentage of women develop a persistent infection (Giuliani et al., 2006).

According to World Health Organization (WHO, 2016), more than one million sexually transmitted infections (STIs) are acquired every day. Every year, approximately 357 million new infections of *Chlamydia trachomatis* (CT) and *Trichomonas vaginalis* (TV),

which are the most common causative agents of STIs, are reported. Pathogens that can be transmitted sexually have been implicated as cofactors in the pathogenesis of cervical cancer (WHO, 2008; INCA, 2015).

The objectives of this study were to investigate the prevalence of HPV, CT, and TV, and to assess the diversity of HPV types. We used the polymerase chain reaction and HPV genotyping by direct sequencing in women with normal and abnormal cytology who used health services in Manaus, Amazonas, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Study groups

A total of 180 women who used public health services were recruited between October 2013 and April 2014 in Manaus, Amazonas, Brazil. Of those women, 133 were recruited from basic health units and 47 were recruited from the Amazon State Foundation Oncology Control Center (FCECON-AM), which is a reference hospital for cancer treatment in the city. The subjects presented with cytopathological, histopathological, and colposcopic indications of uterine cervical pathologies. All subjects were informed about the objectives, benefits, and risks of this study. Recruitment was by invitation and the subjects were required to answer a socio-economic-cultural questionnaire. Informed consent was obtained from all participants. The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Amazonas (CAAE No. 12240113.8.0000.5020).

Sample collection and DNA extraction

Cervical samples were collected using a cytobrush and re-suspended in a 1.5-mL microtube containing 400 μ L TE buffer comprising 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 1 mM EDTA. They were then immediately transported on ice to the Laboratory of Molecular Diagnosis in the Federal University of Amazonas (UFAM), and stored at -80°C until required.

DNA was extracted from the cervical samples using a QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Brazil) following the manufacturer instructions. DNA concentrations were estimated using a BioPhotometer D30 spectrophotometer (Eppendorf, Brazil) by measuring the absorbance at 260 and 280 nm. The samples were then stored at -20°C until required for further processing.

Polymerase chain reaction (PCR) for HPV DNA detection and genotyping

HPV detection was carried out using nested-PCR (nPCR). The first reaction was performed using MY09/MY11 primers (Manos et al., 1989) to amplify a 450-bp fragment. The final volume of the reaction mixture was 25 μ L, comprising 2.5 μ L DNA, 2.5 μ L 10X reaction buffer, 0.8 μ L 50 mM MgCl_2 , 0.5 μ L 10 mM dNTP, 2.5 μ L each primer (5 pmol/ μ L), 0.1 μ L 5U/ μ L Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil), and 13.6 μ L Milli-Q water.

The second reaction was performed using GP5+/GP6+ internal primers (Snijders et al., 1990), which amplified a 150-bp fragment. The final volume of the second reaction mixture was 25 μ L, comprising the sample (1 μ L), 2.5 μ L 10X reaction buffer, 0.8 μ L 50 mM MgCl_2 , 0.5 μ L 10 mM dNTP, 2.5 μ L each primer (5 pmol/ μ L), 0.1 μ L 5U/ μ L Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil), and 15.1 μ L Milli-Q water to complete the final volume. The

conditions for both reactions were as follows: 95°C for 1 min; 40 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and a final extension for 5 min at 72°C.

The PCR products from all positive HPV DNA samples were purified using the ExoSap protocol (GE Healthcare, Brazil) and prepared for sequencing in a final volume of 10 µL, comprising the sample (2 µL), 0.5 µL BigDye™ Terminator, 2 µL 5X reaction buffer, 0.64 µL 5 pmol primers (MY09, MY11, GP5+, or GP6+), and 4.86 µL Milli-Q water. The reaction conditions were as follows: 94°C for 1 min; and 25 cycles of amplification at 96°C for 15 s, 50°C for 15 s, and 60°C for 4 min.

Sequencing was performed on an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer recommendations. The sequences were edited and aligned using version 7.2.5 of BioEdit (Hall, 1999), and compared with the sequences included in the GenBank database.

PCR for *C. trachomatis* DNA detection

C. trachomatis PCR detection was performed using KL1/KL2 primers (Mahony et al., 1993) to amplify a 241-bp fragment of a plasmid DNA of *C. trachomatis*. The final reaction volume (25 µL) comprised 2.5 µL DNA, 2.5 µL 10X reaction buffer, 1 µL 50 mM MgSO₄, 0.5 µL 10 mM dNTP, 2.5 µL each primer (5 pmol/µL), 0.1 µL 5 U/µL Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil), and 13.4 µL Milli-Q. The reaction conditions were as follows: 94°C for 30 s; 40 cycles of amplification at 94°C for 30 s, 64°C for 30 s, and 68°C for 2 min; and a final extension for 5 min at 68°C.

PCR for *T. vaginalis* DNA detection

The DNA of *T. vaginalis* was detected using a touchdown method, and BTUB9/BTUB2 primers (Madico et al., 1998) were used to amplify a 112-bp fragment of a beta-tubulin gene of *T. vaginalis*. The final volume of the reaction mixture was 25 µL, comprising 2 µL DNA, 2.5 µL 10X reaction buffer, 0.8 µL 50 mM MgCl₂, 0.5 µL 10 mM dNTP, 1 µL each primer (5 pmol/µL), 0.1 µL 5 U/µL Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil), and 17.1 µL Milli-Q water. The reaction conditions were as follows: 95°C for 75 s; 60 cycles of denaturation at 95°C for 45 s; annealing starting at 62°C and ending at 52°C for 45 s; and extension at 72°C for 1 min. The annealing temperature was lowered by 1°C every four cycles until it reached 52°C, and this annealing temperature was then maintained until the end of the cycling process.

All PCR reactions were performed in a Veriti thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). Water was included as a negative control, and a previously sequenced and tested sample was used as a positive control. The amplified products for the molecular diagnosis of HPV, *C. trachomatis*, and *T. vaginalis* were resolved by electrophoresis on 1.5% (MY09/MY11), 2.5% (GP5+/GP6+), 2% (KL1/KL2), and 2.5% (BTUB9/BTUB2) agarose gels containing ethidium bromide (0.5 mg/mL), and visualized with a transilluminator. The images were captured using an Olympus SP-500UZ digital camera.

Statistical analysis

We used the chi-square test to calculate the absolute and relative frequencies of the

categorical variables, whereas we used Fisher's test when P values were less than 0.05. The mean and standard deviations were calculated for the quantitative variables using the Kruskal-Wallis test. The level of significance was set at 5%. All statistical analyses were performed using the R 2.9.0 software package.

RESULTS

We recruited 180 women who used the public health service. These women were divided according to cytopathological and histopathological findings. The normal group comprised 133 (73.88%) women who presented with inflammatory cytology, whereas the abnormal group comprised 23 (16.11%) with HSIL and 18 (10%) with LSIL. Table 1 shows the demographic, clinical, and molecular findings, and the relationship between the normal and abnormal status of the women in this study.

Table 1. Relationship between distribution of the studied risk factors and normal or abnormal cytology status.

Characteristics	Abnormal cytology		Normal cytology		P value
	N	%	N	%	
Age (years)					0.0395
16-20	2	4.25	21	15.78	
21-30	10	21.27	43	32.33	
31-40	24	51.06	47	35.33	
41-50	11	23.40	21	15.78	
Education level					0.0131
Primary	21	44.67	29	21.79	
High	22	46.80	77	56.38	
Graduate	4	8.50	22	16.53	
Age at first intercourse					0.4953
12-15	20	42.55	55	41.35	
16-20	25	53.19	60	45.11	
21-30	2	4.25	12	9.02	
Sexual partners					0.0211
1-2	11	23.40	51	38.34	
3-4	15	31.91	47	35.33	
>5	21	44.68	31	23.30	
Condom use					0.0039
No	9	19.14	57	42.86	
Yes	37	78.72	76	57.14	
Sometimes	1	2.12	0		
Marital status					<0.0001
No	1	31.9	57	42.85	
Yes	32	68.08	75	56.38	
Pregnancy					0.0003
No	3	6.38	27	20.30	
Single	3	6.38	27	20.30	
Double	7	14.89	30	22.55	
Multiple (3-9)	34	72.34	49	36.84	
Smoking history					0.2574
Never	32	69.08	93	69.92	
Current	2	4.25	10	7.51	
In the past	13	27.65	22	16.54	
Presence of HPV					<0.0001
No	3	6.38	85	63.90	
Yes	44	93.61	48	36.09	
Presence of CT					0.0364
No	47	100.0	121	90.97	
Yes	0	0.00	12	9.02	
Presence of TV					0.0039
No	47	100.0	109	81.95	
Yes	0	0.00	24	18.04	

HPV: human papillomavirus. CT: *Chlamydia trachomatis*. TV: *Trichomonas vaginalis*.

There were statistically significant differences in age ($P = 0.0395$), education level ($P = 0.0131$), number of sexual partners ($P = 0.0211$), condom use ($P = 0.0039$), marital status ($P < 0.0001$), and pregnancy ($P = 0.0003$) between the normal and abnormal groups. The percentages of HPV DNA were 36.56% (48/133) and 93.88% (46/49) in the normal and abnormal groups, respectively. The percentages of TV and CT DNA were 18.04% (24/133) and 9.02% (12/133) in the normal group, respectively. Table 2 shows that a total of 19 different HPV types were detected in this study: 7 HR, 6 LR, 3 pHR, and 3 undetermined risk (UR).

Table 2. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes and coinfections with *Trichomonas vaginalis* (TV) and *Chlamydia trachomatis* (CT).

Genotypes		Abnormal cytology				Normal cytology			
		HPV		HPV		TV/HPV		CT/HPV	
		N	%	N	%	N	%	N	%
HR	16	20	45.45	15	31.25	1	16.66	2	33.33
	18	-	-	1	2.08	-	-	-	-
	31	3	6.81	2	4.16	-	-	-	-
	33	4	9.09	2	4.16	1	16.66	-	-
	52	1	2.27	-	-	-	-	-	-
pHR	58	8	18.18	4	8.33	-	-	-	-
	59	-	-	1	2.08	-	-	1	16.66
	53	2	4.54	3	6.25	-	-	-	-
	66	-	-	2	4.16	1	16.66	1	16.66
LR	82	-	-	1	2.08	-	-	-	-
	6	1	2.27	-	-	-	-	-	-
	54	-	-	1	2.08	-	-	-	-
	61	-	-	3	6.25	-	-	-	-
	70	-	-	3	6.25	1	16.66	1	16.66
	72	1	2.27	1	2.08	-	-	-	-
UR	81	-	-	2	4.16	-	-	-	-
	62	-	-	1	2.08	1	16.66	-	-
	83	1	2.27	-	-	-	-	-	-
	102	1	2.27	1	2.08	1	16.66	1	16.66
Not identified		2	4.54	5	10.41	-	-	-	-
Total		44		48		6		6	

HR: high risk; pHR: probable high risk; LR: low risk; UR: undetermined risk.

The prevalence of HR HPV was 81.6% (36/44) in the abnormal group and 52.06% (25/48) in the normal group. HPV16 was seen as the most common type in women with abnormal cytology (20/44, 45.45%), followed by (in order of decreasing frequency): HPV58 (8/44, 18.18%); HPV33 (4/44, 9.09%); HPV31 (3/44, 6.81%); HPV53 (2/44, 4.54%); and HPV52, 6, 72, 83, and 102 (1/44, 2.27%). HPV16 was the most common type in the women, even with normal cytology (15/48, 31.25%), followed by (in order of decreasing frequency): HPV58 (4/48, 8.33%); HPV53, 61, and 70 (3/48, 6.25%); HPV31, 33, 66, and 81 (2/48, 4.16%); and HPV18, 59, 82, 54, 72, 62, and 102 (1/48, 2.08%). The percentages of HPV/TV and HPV/CT coinfections were both 12.5% (6/48).

Table 3 shows the HPV types found in the women with abnormal cytology. HPV DNA was detected in 93.61% (44/47) of women with abnormal cytology, in 36.36% (16/44) with LSIL, and 63.63% (28/44) with HSIL.

Table 3. Association between histopathology and human papillomavirus (HPV) positivity.

Genotypes		LSIL (N = 18)		HSIL (N = 29)	
		N	%	N	%
HR	16	6	33.33	14	48.27
	31			3	10.34
	33	2	11.11	2	6.89
	52	1	5.55		
	58	4	22.22	4	13.79
pHR	53			2	6.89
LR	6	1	5.55		
	72			1	3.44
UR	83	1	5.55		
	102			1	3.44
Not identified		1		1	
No HPV detected		2		1	
Total		18		29	

HR: high risk; pHR: probable high risk; LR: low risk; UR: undetermined risk; LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion.

DISCUSSION

In the present study, we determined the prevalence of HPV, CT, and TV infections in women who attended public health services in Manaus, Amazonas, Brazil. We found a HPV detection rate of 36.09% in women with normal cytology and, as expected, 93.61% in women with premalignant and malignant cervical lesions. The prevalence of HPV in women with normal cytology was greater than the prevalence rates reported in the last ten years that range from 13 to 35% among women with normal cytology (Fedrizzi et al., 2008; Fernandes et al., 2009; Lippman et al., 2010; Oliveira et al., 2011; Castro et al., 2011; Rocha et al., 2014; Santos-Filho et al., 2016). Similarly, the rates of occurrence described for women with premalignant and malignant cervical lesions in the last 10 years were lower than those demonstrated in this study (de Paula et al., 2007; Paesi et al., 2009; Oliveira-Silva et al., 2011; Gurgel et al., 2013; Freitas et al., 2014). The most prevalent HR-HPV types were 16, 58, 33, and 31, both in the women with normal cytology and those with premalignant and malignant cervical lesions. The results corroborate the data described by Castro et al. (2011) and Rocha et al. (2014) for the State of Amazonia, which demonstrated high genotypic diversity. The prospective studies have shown that HPV-positive women are at higher risk of developing HSIL-like lesions than HPV-negative women (Khan et al., 2005). These risks increase with the presence of HPV types that are phylogenetically related to HPV16 and HPV18. Precancerous lesions can develop in women without any type of cytopathological abnormality up to two years after the detection of HPV16 or HPV18 DNA (Muñoz et al., 2006). Table 3 shows the types of HPV found in women with premalignant and malignant cervical lesions; in the majority of lesions, HSIL type 16 was present and no type 18 was detected in any of the groups. Although HPV infection is very common, less than 10% of women with an oncogenic type develop some kind of lesion, leading to the belief that the presence of HPV is necessary but not sufficient for the development of these lesions. Therefore, it is a risk cofactor. Among these subjects, there is prolonged use of oral contraceptives, multiparity, tabagism, a high number of sexual partners, and the presence of other STIs such as *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, and HIV (Smith et al., 2004; INCA, 2015).

The current study showed an association between abnormal cytology and all risk factors related to sexual behavior, suggesting that these cofactors directly influence the development of lesions in HPV-positive women.

The prevalence of CT infections found in this study for women with normal cytology was 9.02%. This was lower than the rate described by Santos et al. (2003), which was 20.7% among sexually active women in the city of Manaus, AM, and higher than the prevalence described by Rocha et al. (2014), which was 6.4% among women seeking public health services in Coari, AM, Brazil. In a study in Manaus involving women with infertility correlated with CT, de Lima Freitas et al. (2011) observed a prevalence of 52.8%, which was much higher than that described by Fernandes et al. (2014), who reported a prevalence similar to our results (10.9%) among women with a history of infertility, who had undergone assisted reproduction techniques. Another important study carried out by Neves et al. (2016) on asymptomatic women aged 14-25 years who used public health services in Manaus showed a prevalence of 13.1% for CT infections, whereas in women aged 20-25 years this prevalence was 10.8%, as determined by the Digene Hybrid Capture II Test (HCII CT-ID). Our results corroborate the prevalence range found in the rest of Brazil (9.1-14.3%) (de Paula et al., 2007; Oliveira et al., 2009; Benzaken et al., 2010; Piazzetta et al., 2011; Garcês et al., 2013). CT infection is asymptomatic in almost all women and, if left untreated, can progress to complications such as ectopic pregnancy, pelvic inflammatory disease (PID), and tubal infertility (Golijow et al., 2005). Therefore, it is extremely important to track the pathogen in asymptomatic women to prevent future sequelae.

In this study, we found a prevalence of 18.04% for TV. This prevalence is higher than the prevalence (12.7%) described by Rocha et al. (2014) in a similar study performed in Coari, AM. In Brazil, studies that use molecular methods to investigate the prevalence of VT are scarce, which may be explained by the fact that notification of infection with the disease is not considered compulsory, as it is in many other countries (Hobbs and Seña, 2013). Furthermore, because it does not cause any serious sequelae, many clinicians considered it to be more of a nuisance rather than a public health threat. This makes the control of the disease even more difficult (Bowden and Garnett, 1999). The most important point regarding this pathogen is its association with the transmission of acquired human immunodeficiency virus (HIV), pelvic inflammatory disease (PID), infertility, preterm birth, low birth weight of infants born to infected mothers, and cervical cancer (CDC, 2015).

HPV/CT coinfection was found in 12.5% of the women participating in this study and, similarly, HPV/TV coinfection was noted in 12.5% women. HPV/CT/TV coinfection was found in 6.25% of the women, and this occurred in women infected with HPV of probable high risk, low risk, and undetermined risk (Table 2).

Thus, the results described in this study highlight the importance of the molecular diagnosis of HPV and of the sexually transmitted pathogens identified as possible cofactors for cervical oncogenesis, as well as the facilitators of other STIs including HIV. Moreover, the verification of the coinfection of these agents clarifies their role in the development of cervical cancer, and promotes the early diagnosis and subsequent treatment of women with these STIs. Information about the distribution of HPV types among women in different Brazilian regions is of paramount importance. This knowledge should be taken into account when considering the use of vaccines that confer protection from the various oncogenic types. At present in Brazil, the HPV vaccination campaign is targeting girls aged 9-13 years by using the quadrivalent HPV vaccine, which only provides immunization against HPV6, 11, 16, and 18. Recently, Joura et al. (2015) established the efficacy and immunogenicity of a nine-valent HPV vaccine that can protect against HPV types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, and 58 associated with cervical, vulvar, and vaginal cancer. Considering the prevalence of HR-HPV revealed by

this study (HPV16, 58, 33, and 31), we can infer that the nine-valent vaccine could also be a good option for protecting women from cervical cancers and precancer lesions.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Edson de Freitas Gomes, Dr. Luiz Carlos dos Santos Júnior, Carla Virgínia Lopes Machado, and Larissa de Souza Kirsch for sample collection and interviews, and Maria Ivanilde Silva Araújo, Enedina Nogueira D'Assunção, and Adolfo José da Mota for assisting in the statistical and sequencing analyses. Research supported in part by the Amazonas State Research Support Foundation (FAPEAM). URL: <http://www.fapeam.am.gov.br>.

REFERENCES

- Benzaken AS, Sales DN, Palheta JI, Junior, Pedrosa VL, et al. (2010). Prevalência da infecção por Clamídia e Gonococo em mulheres atendidas na Clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas. *DST J Bras Doenças Sex Transm.* 22: 129-134. <http://dx.doi.org/10.5533/2177-8264-201022304>
- Bowden FJ and Garnett GP (1999). Why is *Trichomonas vaginalis* ignored? *Sex. Transm. Infect.* 75: 372-374.
- Burk RD, Chen Z and Van Doorslaer K (2009). Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics* 12: 281-290. <http://dx.doi.org/10.1159/000214919>
- Castro MM, Farias IP, Borborema-Santos CM, Corrcia G, et al. (2011). Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. *Genet. Mol. Res.* 10: 186-196. <http://dx.doi.org/10.4238/vol10-1gmr992>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2015). Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. CDC, Atlanta.
- de Lima Freitas NS, Borborema-Santos CM, Barroso Serrão das Neves D, Costa de Oliveira CM, et al. (2011). High prevalence detection of *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in endocervical samples of infertile women attending university hospital in Manaus-Amazonas, Brazil. *Gynecol. Obstet. Invest.* 72: 220-226. <http://dx.doi.org/10.1159/000324798>
- de Paula FDF, Fernandes AP, Carmo BB, Vieira DCD, et al. (2007). Molecular detection of *Chlamydia trachomatis* and HPV infections in cervical samples with normal and abnormal cytopathological findings. *Diagn. Cytopathol.* 35: 198-202. <http://dx.doi.org/10.1002/dc.20629>
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, et al. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Fedrizzi EN, Schulp CG, Menezes ME and Ocampos M (2008). Infecção pelo Papillomavirus Humano em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. *J Bras Doenças Sex Transm.* 20: 73-79.
- Fernandes AMS, Daher G, Nuzzi RXP and Petta CA (2009). Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres atendidas em serviço de planejamento familiar. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 31: 235-240. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032009000500006>
- Fernandes LB, Arruda JT, Approbato MS and García-Zapata MTA (2014). Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*: fatores associados à infertilidade em mulheres atendidas em um serviço público de reprodução humana. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 36: 353-358. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-7203201400050002>
- Freitas LB, Chen Z, Muqui EF, Boldrini NA, et al. (2014). Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS One* 9: e100746. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100746>
- Garcês AX, de Martinez AM, Gonçalves CV, Germano FN, et al. (2013). Prevalência de *Chlamydia trachomatis* e fatores de risco associados à infecção detectada em amostra endocervical. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 35: 379-383. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032013000800008>

- Giuliani L, Coletti A, Syrjänen K, Favalli C, et al. (2006). Comparison of DNA sequencing and Roche Linear array in human papillomavirus (HPV) genotyping. *Anticancer Res.* 26 (5B): 3939-3941.
- Golijow CD, Abba MC, Mourón SA, Laguens RM, et al. (2005). *Chlamydia trachomatis* and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol. Oncol.* 96: 181-186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.09.037>
- Gurgel AP, Chagas BS, do Amaral CM, Albuquerque EM, et al. (2013). Prevalence and genetic variability in capsid L1 gene of rare human papillomaviruses (HPV) found in cervical lesions of women from North-East Brazil. *BioMed Res. Int.* 2013: 546354. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/546354>
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, London, 41:95-98.
- Hobbs MM and Seña AC (2013). Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex. Transm. Infect.* 89: 434-438. <http://dx.doi.org/10.1136/sextrans-2013-051057>
- INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) (2015). Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. INCA, Rio de Janeiro.
- Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, et al.; Broad Spectrum HPV Vaccine Study (2015). A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N. Engl. J. Med.* 372: 711-723. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1405044>
- Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, et al. (2005) The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with Human Papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J. Natl. Cancer Inst.* 97: 1072-1079.
- Lippman SA, Sucupira MCA, Jones HE, Luppi CG, et al. (2010). Prevalence, distribution and correlates of endocervical human papillomavirus types in Brazilian women. *Int. J. STD AIDS* 21: 105-109. <http://dx.doi.org/10.1258/ijsa.2009.008436>
- Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT, Jr, et al. (1998). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3205-3210.
- Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW and Chernesky MA (1993). Comparison of plasmid- and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1753-1758.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AI, et al. (1989). The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7: 209-214.
- Muñoz N, Castellsagué X, González AB and Gissmann L (2006). Chapter 1: HPV in etiology of human cancer. *Vaccine*. 24S3:S31-S310.
- Neves D, Sabidó M, Bóto-Menezes C, Benzaken NS, et al. (2016). Evaluation of screening for *Chlamydia trachomatis* among young women in primary health care services in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 32: e00101015.
- Oliveira ML, Amorim MMR, Souza ASR, Albuquerque LCB, et al. (2009). Infecção por *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 54: 506-512.
- Oliveira-Silva M, Lordello CX, Zardo LM, Bonvicino CR, et al. (2011). Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. *Virology* 43: 4. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-8-4>
- Paesi S, Serafini EP, Barea F, Madi SRC, et al. (2009). High prevalence of human papillomavirus type 58 in patients with cervical pre-malignant lesions in southern Brazil. *J. Med. Virol.* 81: 1270-1275. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21410>
- Piazzetta RC, de Carvalho NS, de Andrade RP, Piazzetta G, et al. (2011). Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoea* infections in sexual actives young women at a southern Brazilian city. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 33: 328-333.
- Rocha DAP, Filho RA, Mariño JM and dos Santos CM (2014). "Hidden" sexually transmitted infections among women in primary care health services, Amazonas, Brazil. *Int. J. STD AIDS* 25: 878-886. <http://dx.doi.org/10.1177/0956462414523742>
- Santos C, Teixeira F, Vicente A and Astolfi-Filho S (2003). Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *Braz. J. Infect. Dis.* 7: 91-95. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702003000200001>
- Santos Filho MVC, Gurgel APAD, Lobo CDP, Freitas ACF, et al. (2016). Prevalence of human papillomavirus (HPV), distribution of HPV types and risk factors for infection in HPV-positive women. *Genet. Mol. Res.* 15: gmr15028315.
- Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, et al.; IARC multicentric case-control study (2004). *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int. J. Cancer* 111: 431-439. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.20257>

HPV, *C. trachomatis*, and *T. vaginalis* in Amazonian women

11

- Snijders PJF, van den Brule AJF, Schrijnemakers HF, Snow G, et al. (1990). The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* 71: 173-181. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-71-1-173>
- WHO (World Health Organization) (2008). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections. Available at [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf].
- WHO (World Health Organization) (2016). Sexually Transmitted Infections (STIs). Available at [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>]. Accessed June 20, 2016.

ARTIGO 2: “Diversidade da microbiota vaginal em mulheres amazônicas”. Este artigo será submetido à Revista **PLoS ONE** e explora os 6º, 7º, 8º, 9º e 10º objetivos específicos desta Tese. O artigo é apresentado de acordo com as normas solicitadas pela revista.

1 **Vaginal Microbiome diversity in Amazonian women**

2

3 Evelyn Costa-Lira^{1,2¶*}, Pamella Suely Santa Rosa Pimentel^{1,3}, Roberto Alexandre Alves
4 Barbosa-Filho², Enedina Nogueira de Assunção³, Tainá Raiol⁴, Spartaco Astolfi-Filho^{3,5},
5 Cristina Maria Borborema-Santos^{2,5¶}

6

7 1Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus,
8 Amazonas, Brazil

9 2Laboratório de Diagnóstico Molecular, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade
10 Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

11 3Laboratório Tecnologias do DNA, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do
12 Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

13 4Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Brasília, Distrito Federal, Brazil

14 5Instituto de Ciências Biológicas, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do
15 Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

16 6Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus,
17 Amazonas, Brazil

18

19 *Corresponding author:

20 Évelyn Costa Lira

21 E-mail: costa_eve@yahoo.com.br

22

23 RESUMO

24 As comunidades microbianas exercem um papel importantíssimo para a manutenção da
25 homeostase na vagina e prevenção da colonização por microrganismos patogênicos, mas os
26 mecanismos pelos quais exercem essa influência ainda não são tão bem definidos. Nosso estudo
27 caracterizou a diversidade bacteriana na microbiota vaginal de mulheres sem evidências de
28 qualquer sinal, sintoma ou desordem urogenital; mulheres apresentando candidose
29 vulvovaginal (CVV); mulheres apresentando vaginose bacteriana (VB); e mulheres
30 apresentando lesões pré-malignas do colo do útero. As regiões V1-V2 do gene 16S rRNA foram
31 amplificadas e sequenciadas em plataforma *Next Generation Sequencing* (NGS) a fim de
32 elucidar a relação existente entre esta microbiota e o estado de saúde do trato genital feminino.
33 Nossos dados demonstram que os filos mais abundantes, em ordem decrescente de abundância
34 foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, TM7, *Tenericutes* e
35 *Proteobacteria*. Dos 162 gêneros encontrados, a distribuição mostrou que sete constituíram
36 mais de 95% da microbiota vaginal: *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Shuttleworthia*, *Sneathia*,
37 *Megasphaera*, *Atopobium*, *Clostridium*. O gênero *Lactobacillus* constitui a maior proporção
38 nos quatro grupos estudados. Mulheres com a microbiota apresentando VB e Lesão
39 apresentaram uma abundância relativamente baixa deste gênero em comparação com os outros
40 grupos. Este estudo é o primeiro a caracterizar a comunidade bacteriana encontrada na
41 microbiota vaginal de mulheres amazônicas. Estudos adicionais são necessários para obter uma
42 compreensão mais aprofundada tendo em vista o desenvolvimento de futuras estratégias
43 terapêuticas.

44

45 **Palavras-Chave:** vaginal microbiome, gene 16S rRNA, bactéria, NGS

46

47

48 **Abstract**

49 Microbial communities play a very important role in maintaining homeostasis in the vagina and
50 preventing colonization by pathogenic microorganisms, but the mechanisms by which they
51 exert such influence are not yet so well defined. Our study characterized the bacterial diversity
52 in the vaginal microbial of women without evidence of any sign, symptom or urogenital
53 disorder; women with vulvovaginal candidiasis (CVV); women with bacterial vaginosis (BV);
54 and women with pre-malignant lesions of the cervix. The V1-V2 regions of the 16S rRNA gene
55 were amplified and sequenced on the Next Generation Sequencing (NGS) in order to elucidate
56 the relationship between this microbiota and the state of health of the female genital tract. Our
57 data demonstrate that the most abundant phyla, in descending order of abundance, were
58 *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, TM7, *Tenericutes* e *Proteobacteria*.
59 Of the 162 genera found, the distribution showed that seven constituted more than 95% of the
60 vaginal microbiota: *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Shuttleworthia*, *Sneathia*, *Megasphaera*,
61 *Atopobium*, *Clostridium*. The *Lactobacillus* genus the highest proportion in the four groups
62 studied. Women with the microbiota presented BV and lesion showed a relatively low
63 abundance of this genus compared to the other groups. This study is the first to characterize the
64 bacterial community found in the vaginal microbiota of Amazonian women. Further studies are
65 needed to gain a deeper understanding of the development of future therapeutic strategies.

66

67 **Key words:** vaginal microbiome, 16S rRNA gene, bacterium, NGS

68

69

70

71

72 **Introdução**

73 O corpo humano abriga diversos microrganismos em comunidades distintas associadas
74 ao trato respiratório superior, gastrointestinal, a saliva, vagina e muitas outras superfícies
75 mucosas e tecidos mais profundos [1-3]. Essa interação tem se mostrado essencial para a
76 fisiologia do hospedeiro e pode sofrer alterações de acordo com variações tais como sexo,
77 idade, fatores ambientais e estados patogênicos, no entanto, o papel dessa microbiota nos
78 processos de saúde e doença ainda é pouco conhecido, tendo recebido maior atenção frente às
79 possibilidades de quantificação e tipagem desses microrganismos para conhecimento de sua
80 capacidade metabólica e funcional relacionadas ao corpo humano através de técnicas
81 moleculares independentes de cultivo [4-7].

82 O Projeto Microbioma Humano ao caracterizar as comunidades microbianas associadas
83 aos seres humanos, revelou uma diversidade que pode ser definida como o número e a
84 distribuição de abundância desses microrganismos associados a várias doenças tais como a
85 baixa diversidade no intestino à obesidade e a alta diversidade na vagina à vaginose bacteriana,
86 por exemplo [8]. Tal qual a maioria das cavidades e superfícies do corpo humano, a microbiota
87 vaginal desempenha papel importante na saúde reprodutiva e seu equilíbrio normal é mantido
88 por complexas interações entre os produtos do metabolismo microbiano, o estado hormonal e
89 a resposta imune do hospedeiro, sendo que, tanto a estabilidade quanto a composição dessa
90 microbiota podem desempenhar papel importante na resposta imune do hospedeiro e à
91 susceptibilidade a infecções [9-10].

92 As comunidades microbianas exercem um papel importantíssimo para a manutenção da
93 homeostase na vagina e prevenção da colonização por microrganismos patogênicos, mas os
94 mecanismos pelos quais exercem essa influência ainda não são tão bem definidos. Estudos
95 realizados para avaliar a variação na composição da comunidade microbiana ou para explorar
96 relações ecológicas e responder a questões epidemiológicas exigem métodos que forneçam

97 informações detalhadas e aprofundadas sobre a diversidade microbiana [11]. A utilização de
98 avançados métodos moleculares e biologia computacional para a compreensão apropriada da
99 microbiota vaginal tanto do ecossistema vaginal normal como das diferentes doenças
100 microbianas é necessária para o reconhecimento de microrganismos patogênicos potenciais e
101 de processos fisiológicos de proteção [12-13].

102 Neste estudo, nós utilizamos a amplificação de regiões hipervariáveis V1-V2 do gene
103 16S rRNA e, subsequente sequenciamento em plataforma *Next Generation Sequencing* (NGS)
104 para caracterizar a composição e diversidade bacteriana presente em amostras cervicais de
105 mulheres amazônicas em três diferentes subsítios (endocérvice, ectocérvice e fundo de saco) de
106 mulheres sem evidências de qualquer sinal, sintoma ou desordem urogenital, mulheres
107 apresentando candidose vulvovaginal (CVV), mulheres apresentando vaginose bacteriana (VB)
108 e mulheres apresentando lesões pré-malignas do colo do útero a fim de elucidar a relação
109 existente entre esta microbiota e o estado de saúde do trato genital feminino

110

111 **Material e métodos**

112 **Participantes e Coleta de Amostras**

113 Participaram deste estudo 172 mulheres com idade entre 16-50 anos (média [\pm DP] 32.59
114 [\pm 8,43] anos) que frequentaram o Serviço de ginecologia das Unidades Básicas de Saúde
115 Leonor Mendonça de Freitas, O 08 e Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas
116 (FCECON-AM) entre outubro de 2013 e abril de 2014. As amostras cervicais foram coletadas
117 com o auxílio de espéculos, escovas endocervicais descartáveis (cyto-brush) e espátulas de
118 madeira. Para que não houvesse qualquer perigo de contaminação, as amostras destinadas ao
119 estudo molecular foram coletadas antes da confecção das lâminas citológicas a partir de 3 sítios
120 diferentes (endocérvice, ectocérvice e fundo de saco posterior), em duplicata, perfazendo um
121 total de 1.032 amostras e transferidas para um microtubo descartável de 1,5 mL contendo 500

122 μ L de solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM), as amostras foram
123 mantidas em banho de gelo, encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Molecular, no Centro
124 de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e
125 armazenadas a -80°C até o momento da extração do DNA. Foram confeccionadas lâminas
126 citológicas contendo material ecto- e endocervical para a emissão do laudo citopatológico. No
127 momento da coleta, foram realizados o teste de Whiff e a medição do pH de cada sítio coletado
128 utilizando fitas indicadoras de pH (Merck & Co, Inc., USA). O status VB foi avaliado em todas
129 as participantes do estudo utilizando os critérios clínicos de Amsel et al. [14] e as participantes
130 que preencheram três ou mais dos seguintes critérios foram clinicamente diagnosticados com
131 VB: pH vaginal elevado ($\geq 4,5$), corrimento vaginal homogêneo, liberação de um odor de amina
132 de peixe após a adição de solução de hidróxido de potássio a 10% no fluido vaginal (teste de
133 "Whiff") e/ou a ausência de lactobacilos na citologia oncótica. A CVV foi diagnosticada através
134 da detecção microscópica de números densos de células de levedura em um esfregaço vaginal
135 e pelo exame físico, considerando a presença de leucorréia. A partir das informações clínicas e
136 moleculares, as mulheres participantes do estudo foram divididas em quatro grupos distintos e
137 bem caracterizados: I. Normal (sem evidências de qualquer sinal, sintoma ou desordem
138 urogenital); II. VB (mulheres que preencheram três ou mais dos critérios de Amsel); III. CVV
139 (com a presença de corrimento branco, flocular e aderente à superfície vaginal, confirmadas
140 por inspeção visual, pH vaginal e citopatológico confirmatório) e IV. Lesão (presença de lesões
141 pré-malignas do colo do útero com citopatológico, colposcopia e histopatológico
142 confirmatórios). Os critérios de exclusão foram: gravidez, menstruação, diabetes mellitus,
143 conização ou histerectomia total, terapia de reposição hormonal, uso de duchas vaginais
144 higiênicas, uso de antibióticos, antimicrobianos e/ou antifúngicos (oral ou por aplicação tópica
145 na área vulvar) nos quarenta e cinco (45) dias antecedentes à coleta, mulheres menopausadas,
146 infecção mista de VB e CVV. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da

147 Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) (CAAE n. 12240113.8.000.5020) e todas as
148 participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

149

150 **Extração do DNA total dos esfregaços vaginais**

151 As suspensões contendo os esfregaços foram descongeladas e agitadas vigorosamente
152 em vórtex para uma distribuição uniforme de células. Em seguida, a extração de DNA a partir
153 dos esfregaços vaginais foi realizada utilizando QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Brazil),
154 seguindo as instruções do fabricante, com algumas modificações. Às suspensões, foram
155 adicionados 20 µL de Proteinase K (20 mg / mL), 200 µL de tampão de lise (AL) e 200 µL de
156 TPK (900 µL de TE; 100 µL de Tween 20 a 20% e 20 µL de proteinase K 10 mg/mL), sendo
157 homogeneizado por agitação em vórtex. As misturas foram incubadas a 56°C durante 1 hora.
158 Após a incubação, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto gelado e essa mistura foi então
159 carregada no QIAamp spin column e centrifugada a 8.000 g durante 1 min. Em seguida, a
160 QIAamp spin column foi transferida para um novo microtubo (2 mL) eliminando-se o filtrado
161 que continha. O material da coluna foi lavado com 500 µL de tampão AW1 e com 500 µL do
162 tampão de lavagem AW2 (fornecidos pelo kit). O DNA foi eluído com 50 µL de Tampão AE
163 (fornecido pelo kit), à temperatura ambiente, overnight. A concentração do DNA extraído foi
164 determinada em espectrofotômetro BioSpectrometer® D30 (Eppendorf, Brazil). As amostras
165 foram eluídas de maneira que ficassem a 20 ng/ µL e, em seguida, foram armazenadas em
166 freezer a -80 °C para as análises posteriores.

167

168 **Preparo das bibliotecas de amplicons e sequenciamento do gene**

169 **16S rRNA**

170 As regiões V1 e V2 do gene 16S rRNA foram amplificadas com os *primers* universais

171 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 338R (5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3')

172 [15]. Os *primers forward* e *reverse* foram modificados pela adição de um PGM *sequencing*

173 *adapter* A (5'CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG3') e um PGM *sequencing*

174 *adapter* P1 (5'CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT3'), respectivamente. Foram

175 desenvolvidos ainda 10 barcodes diferentes com 13-15 nucleotídeos para os *primers forward*

176 (5'-TTCCACTTCGCGAT CGGACAATGGCGAT AGGCAATTGCGAT

177 TTCGAGACGCGAT CCGGAGAATCGCGAT TCTGGCAACGGCGAT

178 TTCAATTGGCGAT TCGAAGGCAGGCGAT CCTGCCATTCGCGAT

179 CTAACCACGGCGAT-3') e *reverse* (5'-TTCCACTTCGCGAT TTCCTGCTTCACGAT

180 CCTGCCATTCGCGAT CAGCCAATTCTCGAT CTGGCAATCCTCGAT

181 CTAGGAACCGCGAT TCCTGAATCTCGAT CGGAAGAACCTCGAT

182 TCCTAGAACACGAT CCGGAGAATCGCGAT-3') com o intuito de gerar 100 combinações

183 de barcodes diferentes (S1 Fig). Foram utilizados como critérios para a seleção dos *primers*,

184 intercomplementaridade, intracomplementaridade, Temperatura média de anelamento (T_m) e

185 percentual de GC das sequências após serem analisadas e editadas com o auxílio dos programas

186 Primer3, PerlPrimer e BioEdit 7.5.0.3 [16-18]. O volume final das reações foi de 30 μ L,

187 composto de 2 μ L de DNA (20 ng/ μ L), 3 μ L de Tampão da Enzima 10X, 0.9 μ L de $MgCl_2$ a

188 50 mM, 0.6 μ L de dNTP a 10 mM, 1 μ L de cada primer (5 pmol/ μ L), 0.2 μ L de Platinum®

189 Taq DNA Polymerase 5 U/ μ L (Invitrogen, Brazil), e 21.3 μ L de água Milli-Q. As condições de

190 reação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 30 s, 30 ciclos de 94°C durante

191 15 s, 60°C durante 30 s, 72°C durante 15 s e uma extensão final a 72°C durante 5 min. Todas

192 as reações de PCR foram realizadas em triplicatas utilizando termociclador Veriti (Applied

193 Biosystems, Foster City, CA). Água foi incluída como controle negativo das reações para cada

194 par de barcode primer. Os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de

195 agarose a 1,5% contendo brometo de etídeo (0.5 mg/mL), visualizados em transiluminador e as

196 imagens capturadas utilizando uma câmera digital Olympus SP-500UZ. Em seguida, foram
197 quantificados, individualmente, utilizando Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies,
198 Carlsbad, CA, USA) e, a partir dos resultados obtidos, foram realizadas diluições para que os
199 produtos apresentassem concentrações iguais a 1 ng/μL. Quantidades equimolares de cada
200 amostra foram combinadas em um único microtubo, purificados com o Agencourt® AMPure
201 ® XP Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) e usadas para o preparo de bibliotecas no
202 Ion OneTouch™ 2 System com o Ion PGM™ Template OT2 400 Kit Template (Thermo Fisher
203 Scientific, Waltham, MA, USA). O sequenciamento foi realizado utilizando o Ion PGM™
204 System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) utilizando o Ion 318™ Chip v2 PGM
205 Ion Torrent.

206

207 **Análises das Sequências**

208 Os dados gerados a partir do sequenciamento foram processados pelo *software* Torrent
209 Suite (plataforma PGM) e armazenados em formato FASTAq, contendo as sequências brutas e
210 seus respectivos valores de qualidade. Em seguida, essas sequências foram avaliadas quanto à
211 sua qualidade e presença de adaptadores por meio do programa FastQC v0.11.2
212 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Sequências com tamanho
213 inferior a 100pb e média de valores de qualidade PHRED <20 foram removidas com o programa
214 PRINSEQ [19]. Scripts na linguagem de programação Perl foram desenvolvidos para a
215 separação das sequências por amostra e remoção de barcodes. A identificação destes foi feita
216 admitindo-se até um erro de nucleotídeo na comparação com as sequências. A análise de
217 diversidade foi realizada utilizando o programa QIIME v1.8 [20]. As sequências que atenderam
218 aos critérios de classificação e qualidade foram alinhadas contra as sequências disponíveis no
219 banco de dados Greengenes pelo método PyNAST [21]. As sequências válidas foram
220 classificadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) assumindo-se 97% como valor

221 limite de similaridade pelo método UCLUST. Os dados obtidos foram submetidos à análise de
222 diversidade alfa pelos índices de Shannon, Simpson e Chao1. Curvas de rarefação foram
223 geradas para avaliação da riqueza de espécies por meio de amostragens de igual tamanho de
224 cada amostra e verificação do aumento no número de UTOs únicas por condição experimental.
225 Além disso, medidas de diversidade beta foram calculadas usando a técnica de Jackknife, que
226 consiste na reamostragem de um subconjunto de dados de profundidade referente a 75% da
227 menor amostra, sendo produzidas 10 reamostragens (repetições) para cada amostra. As matrizes
228 de distância para cada conjunto de dados foram calculadas com o método UniFrac com peso
229 (weighted-UniFrac) e utilizadas como base para o agrupamento hierárquico com UPGMA
230 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e componentes de PCoA (Principal
231 Coordinates Analysis), para avaliar o grau de variação entre as repetições, exibida por elipses
232 de confiança. Empregou-se o teste T para verificar diferenças estatisticamente significativas
233 entre os grupos. Para esta análise, as amostras foram agrupadas por condição (presença de
234 vaginose, lesão, candida ou autóctone) e por sítio de coleta na cérvix. O pacote phyloseq do R
235 [22] foi utilizado para as análises complementares em diferentes níveis taxonômicos e
236 representação gráfica dos resultados obtidos.

237

238 **RESULTADOS**

239 Durante a montagem das bibliotecas, foram perdidas algumas amostras, em testes de
240 amplificação, estas amostras foram excluídas em uma nova triagem realizada para o
241 carregamento do Chip. Assim, para efeito de comparação, como proposto, as 148 mulheres
242 participantes deste estudo, foram divididas em 4 grupos: Normal (n = 40), VB (n = 31), CVV
243 (n = 33) e Lesão (n = 44). Após sequenciamento, foram obtidas 32.334.268 sequências para as
244 amostras examinadas. Após a filtragem inicial, foram recuperadas um total de 13.484.403 de
245 reads, com uma média de 91.110 leituras por amostra. A curva de rarefação foi gerada

246 assumindo-se um corte de similaridade de 97%. Isto significa que o aumento do número de
 247 sequências por amostra não aumentaria o número de UTOs obtidas em 97% das amostras,
 248 indicando que a amostragem foi suficiente para garantir a cobertura da diversidade microbiana
 249 total encontrada para os 4 grupos (Fig 1A). A diversidade alfa da microbiota vaginal foi
 250 demonstrada através da comparação realizada pelos índices de Shannon, Simpson e Chao1 (Fig
 251 1B). Foram encontradas diferenças significativas (teste T, $p < 0.05$) de maior diversidade nos
 252 grupos VB e Lesão quando comparados ao grupo Normal, diferente do resultado encontrado
 253 para o grupo CVV, o que indica uma diversidade semelhante ao grupo Normal.

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

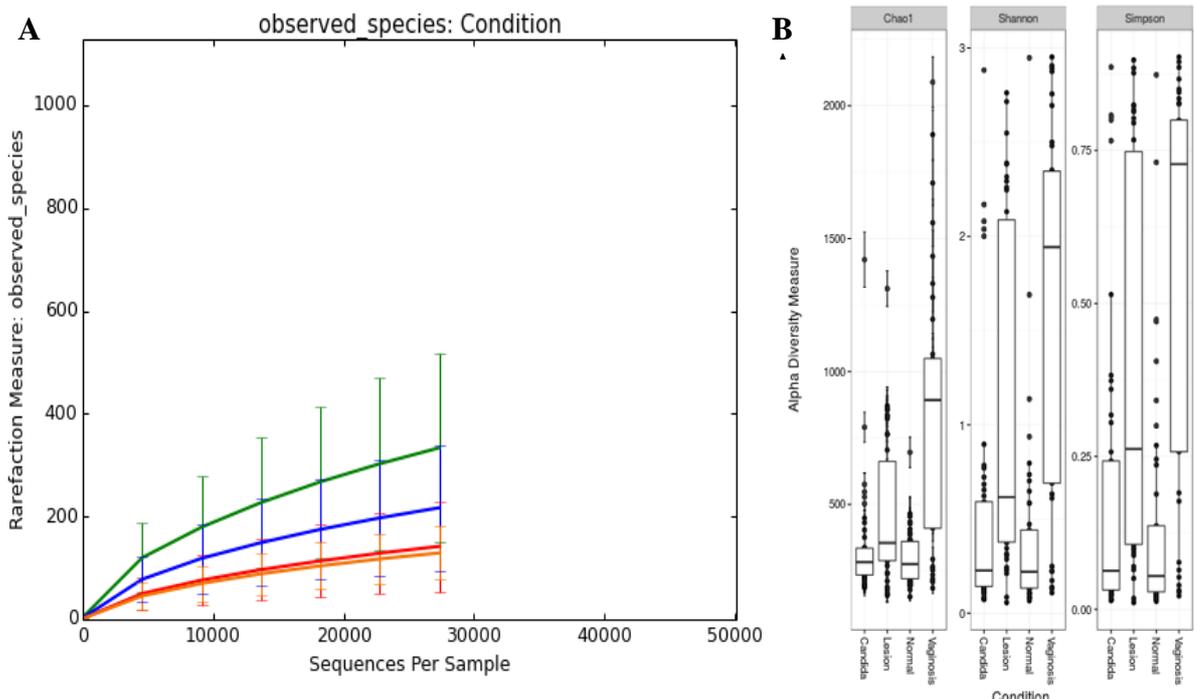


Fig 1 Curvas de Rarefação utilizadas para estimar a riqueza microbiana e Médias da diversidade alfa. **A.** As curvas de rarefação mostram o número de OTUs por amostra gerados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA para cada grupo de estudo. Normal (amarelo), Candida (vermelho), Lesão (azul) e Vaginose (verde); **B.** Índices Chao1, Simpson e Sannon utilizados para estimar a diversidade microbiana.

267 A comparação da diversidade alfa entre os sítios endocérvice, ectocérvice e fundo de
 268 saco das amostras também foi realizada, no entanto, não foram encontrados resultados
 269 significativos (Fig 2).

271

272

273

274

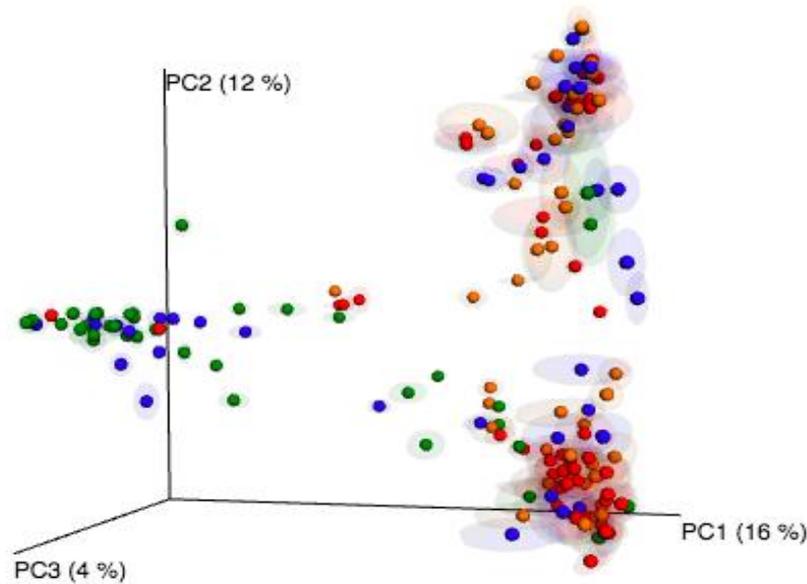
275

276

277

278

279



280 **Fig 2. Diversidade das espécies bacterianas encontradas.** Análise de coordenadas principais (PCoA), realizada
 281 com base em métricas de distância filogenéticas (UniFrac) para a demonstração da diversidade beta, ilustrando um
 agrupamento distinto dentro do grupo Vaginose. Normal: Amarelo; Candida: Vermelho; Vaginose: verde e Lesão:
 Azul

282

283

284

285

286

287

288

289

290

Tabela 1. Diferenças na diversidade microbiana encontrada entre os grupos de estudo

291

292

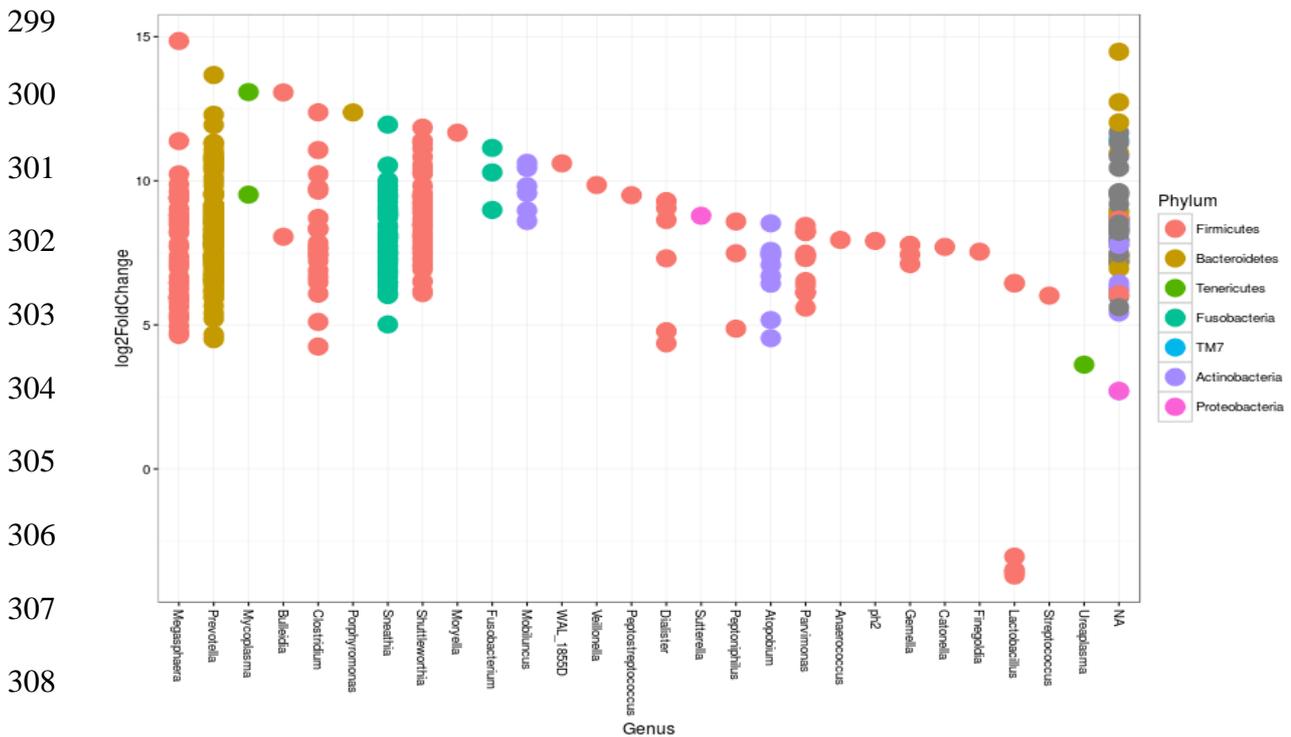
Grupos/Condições	Normal (p-value)	Candida (p-value)	Vaginose (p-value)	Lesão (p-value)
<i>Normal</i>	1,1006E-66	1	5,57755E-14*	5,02476E-38*
<i>Candida</i>	1	4,09733E-73	1,11862E-11*	2,21818E-34*
<i>Vaginose</i>	5,57755E-14*	1,11862E-11*	2,18554E-05	0,000109538*
<i>Lesão</i>	5,02476E-38*	0,086609201	0,000109538*	1

Teste *T*-Student com *p*-valores ajustados pela correção de Bonferroni

293

294

295 A estrutura da microbiota vaginal em mulheres amazônicas, classificadas a nível de Filo,
 296 é demonstrada na Fig 3. Nossos dados revelaram que os sete maiores filios, em ordem
 297 decrescente de abundância foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*,
 298 TM7, *Tenericutes* e *Proteobacteria*.



309 **Fig 3. Abundância relativa das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) encontradas, a nível de Filo**
 310 **entre os grupos de estudo**

312 Um total de 162 gêneros foram encontrados neste estudo. A distribuição mostrou que
 313 sete destes gêneros constituíram mais de 95% da microbiota vaginal: *Lactobacillus*, *Prevotella*,
 314 *Shuttleworthia*, *Sneathia*, *Megasphaera*, *Atopobium*, *Clostridium*. O gênero *Lactobacillus*
 315 constitui a maior proporção nos quatro grupos estudados (Fig 3). No entanto, é visível que
 316 pacientes VB e Lesão apresentaram uma abundância relativamente baixa deste gênero em
 317 comparação com os outros grupos.

318
 319

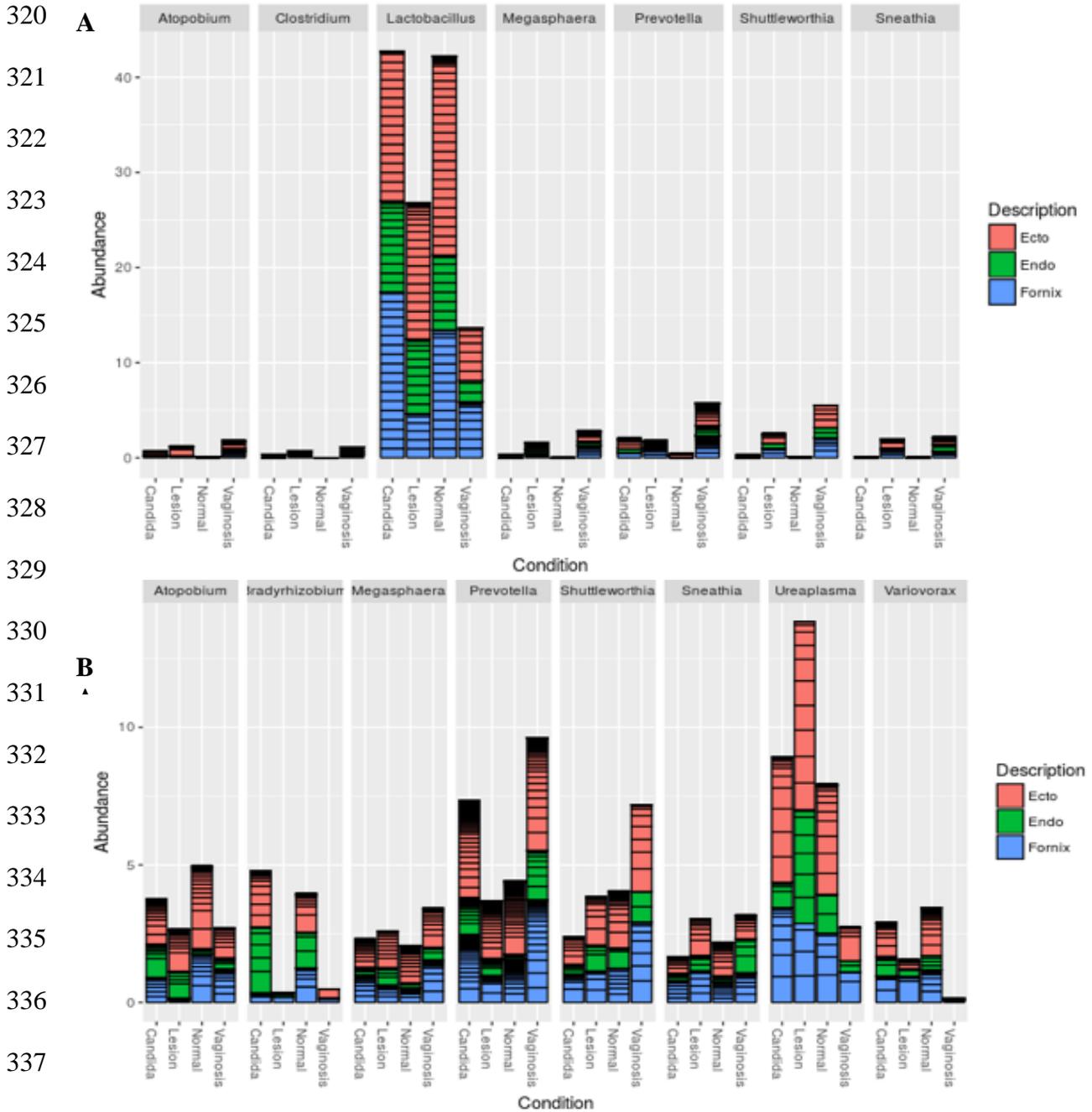


Fig 4. Abundância relativa de OTUs, a nível de Gênero entre os grupos de estudo. A. Com a representatividade do gênero *Lactobacillus*. **B.** Sem a representatividade do gênero *Lactobacillus*. A representação entre os sítios ectocérvice (laranjado), Endocérvice (verde) e Ectocérvice (azul).

A Fig 4B mostra a estrutura da composição da microbiota vaginal nas diferentes

condições ao excluirmos o gênero *Lactobacillus* (mais abundante, como visto anteriormente).

O gênero *Ureaplasma* mostra-se muito mais abundante nas amostras com Lesão do que nas

344 amostras das demais condições. Em adição, chama-se a atenção para o gênero *Shuttleworthia*,
345 presente em considerável abundância nas amostras Vaginose.

346

347 **Discussão**

348 Nossos resultados apontam *Lactobacillus* spp. como as espécies bacterianas
349 predominantes no trato vaginal. É sabido que a predominância de *Lactobacillus* sp. no conteúdo
350 vaginal normal vem sendo descrita pelos mais diversos estudos nos últimos anos, embora
351 existam diferenças na composição das espécies e abundância de populações em comunidades
352 bacterianas [23-24, 11, 25-28]. Ma et al. [29] definiram a microbiota vaginal normal como uma
353 microbiota funcional e ao mesmo tempo benéfica ao seu hospedeiro, independente de sua
354 composição. Desta forma, diferentes tipos de comunidades poderiam ser considerados
355 saudáveis na ausência de sintomas com ou sem a presença de espécies de lactobacilos comuns,
356 mesmo apresentando diferentes graus de predisposição a infecções por patógenos sexualmente
357 transmissíveis. Huang et al. [12] também descreveram a existência de vários tipos de
358 comunidades com diferenças na composição e abundância relativa das espécies e, além disso,
359 a variação entre grupos raciais e étnicos, evidenciando que a microbiota vaginal é muito mais
360 heterogênea e diversa do que se imaginava. *Lactobacillus* spp. são conhecidas por seu alto
361 poder de proteção ao ambiente vaginal, já que são capazes de aderir ao muco [30] e interromper
362 biofilmes [31], além de produzir bacteriocinas [32], biosurfactantes [33] e ácido lático [34],
363 tornando-se responsáveis pela determinação do pH hostil nessa região (> 4,5) [35-36] e
364 prevenção do crescimento de microrganismos associados à vaginose bacteriana (VB) [25, 37]
365 e infecções do trato urinário [38], contribuindo para a redução do risco de aquisição e
366 transmissão de espécies de *Candida* [39] e de outros patógenos sexualmente transmissíveis
367 como o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) [40], o Papillomavírus Humano (HPV)

368 [41, 10, 42], o Herpesvírus Simples 2 (HSV-2) [43-44], *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia*
369 *trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* [45-46]. A VB é considerada uma desordem vaginal
370 polimicrobiana, altamente prevalente em mulheres que se encontram na fase reprodutiva,
371 caracterizada pela depleção das espécies de *Lactobacillus* e pelo crescimento de várias outras
372 bactérias anaeróbicas incluindo espécies de *Mobiluncus*, *Prevotella*, *Mycoplasma* e *Atopobium*,
373 tendo como bactéria predominante a *Gardnerella vaginalis* e que leva ao aparecimento de
374 corrimento vaginal com odor desagradável, o qual se acentua durante a menstruação ou após
375 uma relação sexual, com a presença do esperma de pH básico no ambiente vaginal, no entanto,
376 não é considerada uma doença sexualmente transmissível, mas uma facilitadora para a infecção
377 de outros patógenos sexualmente transmissíveis [47-52]. Oakley et al. [53] caracterizaram a
378 microbiota vaginal de mulheres americanas VB+ comparando-as à mulheres VB- e relataram
379 uma grande diferença na estrutura das comunidades microbianas entre essas mulheres ao
380 associar o aumento da riqueza e diversidade bacteriana à mulheres VB+. Em [54], Liu et al.,
381 descreveram os gêneros *Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Peptoniphilus*, *Dialister* e
382 *Sneathia*, como gêneros altamente associados à VB. Este estudo relata uma comunidade
383 bacteriana dominada por *Lactobacillus* sp. sem excluir, no entanto, a existência de bactérias
384 anaeróbicas como: *Prevotella*, *Megasphaera* e *Atopobium*. De todos os grupos estudados, VB se
385 demonstrou como o mais diverso. Estes resultados são confirmados pelo estudo realizado por
386 Muzny et al. [50], em que evidenciam a existência de quatro comunidades bacterianas
387 associadas a essa condição: I. dominada por *Lactobacillus*; II. dominada por *Lachospiraceae*;
388 III. dominada por *Prevotella* e IV. dominada por *Sneathia*. A candidose vulvovaginal (CVV) é
389 um dos tipos mais comuns de vaginites infecciosas com sintomas de inflamação que afeta as
390 mulheres no mundo inteiro, caracterizada pelo crescimento excessivo de *Candida* spp., tendo
391 como causadora mais frequente a *Candida albicans* [55]. Essas espécies de fungos comensais,
392 das mucosas vaginal e digestiva, podem se tornar patogênicas diante de mudanças que alteram

393 o pH da vagina ou hormonais [56]. A microbiota vaginal colonizada por *Candida* spp. é pouco
394 explorada e seu papel é altamente controverso na literatura [57]. Zhou et al. [58] compararam
395 a diversidade microbiana entre mulheres que apresentavam CVV recorrente e mulheres
396 saudáveis e evidenciaram a não existência de alteração nas comunidades microbianas dessas
397 mulheres, ou seja, não houve qualquer correlação da composição bacteriana com as infecções
398 fúngicas recorrentes. Além disso, essas mulheres não apresentavam diminuição de
399 *Lactobacillus* sp., sugerindo que não existe um papel de proteção definido dessas bactérias
400 contra as infecções fúngicas. Outro estudo realizado por Liu et al. [59], caracterizou a
401 microbiota vaginal em mulheres com VB/CVV antes e depois de serem tratadas e
402 demonstraram que o perfil dessas comunidades após o tratamento é semelhante ao perfil
403 encontrado em mulheres saudáveis, indicando que a infecção por *Candida* sp. pode até criar
404 um ambiente favorável e amigável para o crescimento de *Lactobacillus* sp. e vice-versa. Nossos
405 resultados demonstram uma composição bacteriana similar entre mulheres apresentando CVV
406 e mulheres com microbiota autóctone, como já era esperado. Hong et al. [60] destacaram que a
407 maioria dos casos de VB são acompanhados por CVV e sugerem que os fungos, assim como as
408 bactérias devem ser considerados em investigações da microbiota vaginal, já que podem prover
409 mais informações relativas as comunidades encontradas ali. As lesões intra-epiteliais
410 escamosas (squamous intra-epithelial lesions – SIL) são lesões precursoras do câncer cervical
411 e são classificadas, dependendo do grau de perda da diferenciação epitelial, em alto ou baixo
412 grau e, geralmente, provocam alterações morfológicas características, detectáveis pela citologia
413 dos raspados cérvico-vaginais e histopatologia [61]. A infecção persistente com subtipos
414 oncogênicos do HPV é considerada uma condição necessária para os casos de câncer cervical,
415 no entanto, sendo esta uma doença multifatorial, fatores genéticos, ambientais, hormonais e
416 imunológicos podem estar envolvidos em adição ao HPV, já que apenas 10% das mulheres
417 infectadas pelo HPV desenvolverão o câncer cervical [62-64]. Os mecanismos de persistência

418 da infecção pelo HPV não são bem compreendidos e estudos voltados ao conhecimento da
419 estrutura e composição da microbiota vaginal na presença do HPV podem revelar mecanismos
420 pelos quais essa microbiota, as comunidades ali encontradas ou até mesmo um conjunto de
421 bactérias específicas forneça controle da infecção latente e progressão de lesões para o câncer
422 cervical [65]. Entre os poucos estudos relacionados ao estudo da microbiota vaginal em
423 mulheres HPV+ destaca-se o de Lee et al. [28], que destacaram o fato de que as concentrações
424 de *Lactobacillus* sp. em mulheres HPV+ são mais baixas em relação às encontradas em
425 mulheres HPV-. Em adição, identificaram as *Fusobacteria* e *Sneathia* spp. como bactérias
426 associadas à presença de HPV. Um dos únicos estudos que correlacionaram a estrutura da
427 microbiota vaginal à presença de lesões cervicais foi publicado por Mitra et al. [10], em que
428 evidenciaram uma potencial relação da microbiota vaginal com a infecção pelo HPV e também
429 à progressão de lesões para o câncer cervical, no entanto, sem encontrarem qualquer evidência
430 significativa. Além disso, seu estudo confirmou os dados sobre as concentrações baixas de
431 *Lactobacillus* sp. entre as mulheres estudadas. Ravel et al. [26], bem como Gajer et al. [66]
432 classificaram a microbiota vaginal com a existência de 5 comunidades microbianas diferentes
433 (community state type – CST), sendo as comunidades I, II, III e V dominadas por *Lactobacillus*
434 *crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*, respectivamente, e a comunidade IV, subdividida
435 em 2 subgrupos: IVA. dominada por *L. crispatus* ou *iners* com a presença de alguns
436 microrganismos anaeróbios e IVB. dominada por gêneros essencialmente anaeróbios tais como
437 *Atopobium*, *Parvimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella* e *Mobiluncus*. Já Brotman et al. [65]
438 categorizaram a microbiota vaginal de mulheres HPV+ em CST IVA e B (71%), CST III (72%),
439 CST I (45%) e CST II (12%), evidenciando a correlação da alta prevalência de HPV em
440 mulheres com abundância relativamente baixa de *Lactobacillus* spp. Nossos dados não
441 puderam ser comparados diretamente com os resultados demonstrados por Ravel et al. [26],
442 Gajer et al. [66] e Brotman et al. [65], já que nossas análises foram conduzidas somente até

443 gênero, devido a limitações da plataforma utilizada para o desenvolvimento deste estudo. É
444 bem provável que possamos identificar diferenças a nível de gênero ao compararmos a
445 composição da microbiota vaginal, mas com certeza, as diferenças a nível de espécie são
446 extremamente necessárias para o entendimento do papel fisiológico dessa microbiota tanto para
447 a manutenção do equilíbrio normal quanto de mecanismos patogênicos no desenvolvimento de
448 doenças relacionadas à microbiota vaginal.

449 Este estudo é o primeiro a caracterizar a comunidade bacteriana encontrada na
450 microbiota vaginal de mulheres amazônicas pelo uso do sequenciamento das regiões
451 hipervariáveis V1-V2 do gene 16S rRNA, além de realizar a comparação dessas comunidades
452 em diferentes condições. Avanços no entendimento das relações existentes nessa microbiota
453 podem promover a saúde vaginal. Apesar do papel protetor associado a microbiota vaginal
454 como um todo, muitos detalhes ainda precisam ser esclarecidos. Ao retirar o gênero
455 *Lactobacillus*, evidenciou-se uma presença expressiva do gênero *Ureaplasma* no grupo Lesão,
456 diferente dos resultados encontrados para os outros grupos de estudo. Estudos adicionais são
457 necessários para o esclarecimento quanto ao papel deste gênero na microbiota vaginal de
458 mulheres que apresentam lesões do tipo HSIL. Este estudo fornece uma oportunidade para uma
459 compreensão mais aprofundada do trato genital feminino e se caracteriza como um ponto de
460 partida tendo em vista o desenvolvimento de estratégias terapêuticas num futuro próximo.

461

462 REFERÊNCIAS

- 463 1. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human
464 microbiome project. *Nature*, 2007; 449:804-810.
- 465 2. Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y, et al. Molecular analysis of the Diversity
466 of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics*, 2010; 11(488):1-
467 16.
-

- 468 3. Ribet D, Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues.
469 *Microbes and Infection*, 2015; 17:173-183.
- 470 4. Dethlefsen L, Mcfall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on
471 human-microbe mutualism and disease. *Nature*, 2007; 449:811-818.
- 472 5. Gonzalez A, Clemente JC, Shade A, Metcalf JL, Song S, Prithiviraj B, et al. Our microbial
473 selves: what ecology can teach us. *EMBO Rep*, 2011; 12(8):775-84.
- 474 6. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature*
475 *Reviews. Genetics*, 2012; 13(4):260-270.
- 476 7. Eloe-Fadrosh EA, Rasko DA. The Human Microbiome: From Symbiosis to Pathogenesis.
477 *The Human Microbiome*, 2013; 64:145-63.
- 478 8. HMPC. Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome
479 research. *Nature*, 2012; 13(486):215-21, 2012.
- 480 9. Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women
481 with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infectious*
482 *Diseases*, 2013; 13:271.
- 483 10. Mitra A, Macintyre DA, Lee YS, SMITH A, MARCHESI JR, LEHNE B, et al. Cervical
484 intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome
485 diversity. *Scientific Reports*, 2015; 5(16865):1-11.
- 486 11. Zhou X, Hansmann MA, Davis CC, Suzuki H, Brown CJ, Schütte U. The vaginal bacterial
487 communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS*
488 *Immunol Med Microbiol*, 2010; 58:169–81.
- 489 12. Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, Jefferson KK, Buck GA. The Changing Landscape of
490 the Vaginal Microbiome. *Clin Lab Med*, 2014; 34:747–761.
- 491 13. White BA, Creedon DJ, Nelson KE, Wilson BA. The vaginal microbiome in health and
492 disease. *TEM*, 2011; 22:389–93.
-

- 493 14. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific
494 vaginitis. Diagnostic criteria and microbial. *Am J Med*, 1983; 74(1):14-22.
- 495 15. Mattila HR, Rios, D, Walker-Sperling, VE, Roeselers, G, Newton IL. Characterization of
496 the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities
497 when colonies are genetically diverse. *PLoS ONE*, 2012; 7(3):e32962.
- 498 16. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
499 program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, London, 1999; 41: 95-98.
- 500 17. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist
501 programmers. *Methods Mol Biol*, 2000; 132:365-86.
- 502 18. Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite
503 and real-time PCR. *Bioinformatics*, 2004; 20(15):2471-2472.
- 504 19. Schmieder R.; Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets.
505 *Bioinformatics*, 2011; 27(6):863-4.
- 506 20. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello, EK. QIIME
507 allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010;
508 7(5):335-336.
- 509 21. Caporaso JG, Bittinger K, Bushman, FD, Desantis TZ, Andersen GL, Knight R. PyNAST:
510 a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, 2010; 26(2):266-
511 267.
- 512 22. Mcmurdie PJ, Holmes, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and
513 graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 2013; 8(4):e61217.
- 514 23. Sobel JD. Is there a protective role for vaginal flora? *Current Infectious Disease Reports*,
515 1999; 1:379-383.
- 516 24. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH human
517 microbiome project. *Genome Res*, 2009; 19: 2317–2323.
-

- 518 25. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, THOMAS KK, AGNEW KJ, et al. Temporal
519 Variability of Human Vaginal Bacteria and Relationship with Bacterial Vaginosis. PLoS ONE,
520 2010; 5(4): e10197.
- 521 26. Ravel J, Gajer P, Abdo, Z, Schneider GM, Koenig SSK, Mcculle SL, Karlebach S, et al.
522 Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc. Natl. acad. Sci. USA, 2011; 108(1):
523 4680-87.
- 524 27. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Matsen FA, Fiedler TL, Hall RW, et al. Bacterial
525 communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal
526 relationships of microbiota to clinical criteria. PLoS One, 2012; 7: e37818.
- 527 28. Lee JE, Lee S, Lee H, Song YM, Lee K, Han MJ, et al. Association of the vaginal microbiota
528 with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. PLoS One, 8: e63514.
- 529 29. Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Disease. Annu
530 Rev Microbiol, 2012; 66:371–389.
- 531 30. Boris S, Barbés C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal
532 pathogens. Microbes Infect, 2000; 2:543-546.
- 533 31. Mcmillan A, Dell M, Zellar MP, Cribby S, Martz S, Hong, E. Disruption of urogenital
534 biofilms by lactobacilli. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011; 86:58–64.
- 535 32. Aroutcheva A, Gariti D, Simon M. Shott S, Faro J, Simoes JA et al. Defense factors of
536 vaginal lactobacilli. Am J Obstet Gynecol, 2001; 185:375–379.
- 537 33. Reid G, Heinemann C, Velraeds M, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Biosurfactants
538 produced by Lactobacillus. Methods Enzymol, 1999; 310:426–33.
- 539 34. Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate
540 ratio is consistent with bacteria being the primary source. Hum Reprod, 2001; 16:1809–1813.
- 541 35. Hickey RJ, Zhou X, Pierson JD, Ravel J, Forney LJ. Understanding vaginal microbiome
542 complexity from an ecological perspective. Transl Res, 2012; 160(4):267-282.
-

- 543 36. Gautam R, Borgdorff H, Jespers V, Francis SC, Verhelst R, Mwaura M, et al. Correlates of
544 the molecular vaginal microbiota composition of African women. *BMC Infect Dis*, 2015; 15:86.
- 545 37. Puapermpoonsiri S, Kato N, Watanabe K, Ueno K, Chongsomchai C, Lumbiganon P, et al.
546 Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in Japanese and Thai pregnant women.
547 *Clinical infectious diseases* 1996; 23: 748–752.
- 548 38. Gupta K, Stapleton AE, Hooton TM, Roberts PL, Fennell CL, Stamm WE. Inverse
549 association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women
550 with recurrent urinary tract infections. *Journal of Infectious Diseases* 1998; 178: 446–450.
- 551 39. Borgdorff H, Tsivtsivadze E, Verhelst R, Marzorati M, Jurriaans S, Ndayisaba GF, et al.
552 *Lactobacillus*-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI
553 prevalence and genital HIV viral load in African women. *ISME J*, 2014; 8(9):1781-93.
- 554 40. Petrova MI, van den Broek M, Balzarini J, Vanderleyden J, Lebeer S. Vaginal microbiota
555 and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiol Rev*, 2013; 37(5): 762–792.
- 556 41. Clarke MA, Rodriguez AC, Gage JC, Herrero R, Hildesheim A, Wacholder S, et al. A large,
557 population-based study of age-related associations between vaginal pH and human
558 papillomavirus infection. *BMC Infectious Diseases* 2012; 12:33.
- 559 42. Rodriguez-Cerdeira C, Sanchez-Blanco E, Alba A. Evaluation of association between
560 vaginal Infections and high-risk human Papillomavirus types in female sex workers in Spain.
561 *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2012: 240190.
- 562 43. Kaul R, Nagelkerke NJ, Kimani J, Ngugi E, Bwayo JJ, Macdonald KS, et al. Prevalent
563 herpes simplex virus type 2 infection is associated with altered vaginal flora and an increased
564 susceptibility to multiple sexually transmitted infections. *J Infect Dis*, 2007; 196:1692–7.
- 565 44. Conti C, Malacrino C, Mastromarino P. Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal
566 lactobacilli. *J Physiol Pharmacol*, 2009; 60(6):19-26.
-

- 567 45. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a
568 strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis*,
569 2003; 36:663-668.
- 570 46. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW, Zhang J, et al. Bacterial
571 vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal,
572 chlamydial, and trichomonal genital infection. *J. Infect. Dis*, 2010; 202:1907–1915.
- 573 47. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, Temmerman M, Vaneechoutte M. Culture-independent
574 analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of *Atopobium vaginae* with
575 bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*, 2004; 191:1130–1132.
- 576 48. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV
577 acquisition: a meta-analysis of published studies. *Aids*, 2008; 22(12):1493–1501.
- 578 49. Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilm
579 formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis*
580 relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology*, 2010; 156(Pt2):392–
581 9.
- 582 50. Muzny CA, Sunesara IR, Kumar R, Mena LA, Griswold ME, Martin DH. Characterization
583 of the vaginal microbiota among sexual risk behavior groups of women with bacterial
584 vaginosis. *PLoS ONE*, 2013; 8(11): e80254, 2013.
- 585 51. Rodríguez MA, Lorenzo AG, Hernández TC. Diagnóstico de vaginosis bacteriana.
586 Aspectos clínicos y estudios microbiológicos. *Rev Méd Electrón*, 2014; 36(3): 325-338.
- 587 52. Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The Human Microbiome during Bacterial
588 Vaginosis. *Clin Microbiol Rev*, 2016; 29(2): 223-38.
- 589 53. Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN. Diversity of Human Vaginal Bacterial
590 Communities and Associations with Clinically Defined Bacterial Vaginosis. *Appl Environ*
591 *Microbiol*, 2008; 74(15): 4898–4909.
-

- 592 54. Liu Y, Hao W, Duan C, Tan J, Xu W, et al. Comparative Analysis of Vaginal Bacterial
593 Diversity in Northern-Chinese Women Associated With or Without Bacterial Vaginosis. *J*
594 *Medical Microbiol Diagnosis*, 2012; S5:001.
- 595 55. Ilkit M, Guzel AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal
596 candidosis: A mycological perspective. *Critical Reviews in Microbiology*, 2011; 37: 250–261.
- 597 56. CDC. Center for Disease Control and Prevention. Fungal Diseases: Genital/Vulvovaginal
598 candidiasis. Disponível em:
599 <<http://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/genital/index.html>>. Acesso em: 20 jun
600 2017.
- 601 57. Bradford LL, Ravel J, Bruno V. Understanding Vulvovaginal Candidiasis Through a
602 Community Genomics Approach. *Cur Fungal Infect Rep*, 2013; 7(2):126-131.
- 603 58. Zhou X, Westman R, Hickey R, Hansmann MA, Kennedy C, Osborn TW, Forney LJ.
604 Vaginal Microbiota of Women with Frequent Vulvovaginal Candidiasis. *Infection and*
605 *Immunity*, 2009; 77(9):4130–4135.
- 606 59. Liu M-B, Xu S-R, He Y, Deng G-H, Sheng H-F, Huang, X-M, et al. Diverse Vaginal
607 Microbiomes in Reproductive-Age Women with Vulvovaginal Candidiasis. *PLoS ONE*, 2013;
608 8(11): e79812.
- 609 60. Hong KH, Hong SK, Cho SI, Ra E, Han KH, Kang SB, Kim EC, Park SS, Seong MW.
610 Analysis of the Vaginal Microbiome by Next-Generation Sequencing and Evaluation of its
611 Performance as a Clinical Diagnostic Tool in Vaginitis. *Ann Lab Med*, 2016; 36:441-449.
- 612 61. Wolschick NM, Consolaro MEL, Suzuki LE, Boer CG. Câncer do colo do útero: tecnologias
613 emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. *RBAC*, 2007; 39(2):123-129.
- 614 62. Psyrri A, Dimaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin*
615 *Pract Oncol*, 2008; 5:24-31.
-

616 63. Schmeink CE, Massuger LF, Lensenink CH, Quint WG, Witte BI, Berkhof J, et al.
617 Prospective follow-up of 2,065 young unscreened women to study human papillomavirus
618 incidence and clearance. *International Journal of Cancer*, 2013; 133:172–181.

619 64. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da saúde.
620 Coordenação de prevenção e vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio
621 de Janeiro: INCA, 122p, 2015.

622 65. BROTMAN RM, SHARDELL MD, GAJER P, TRACY JK, ZENILMAN JM, RAVEL J,
623 et al. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human
624 papillomavirus detection. *J Infect Dis*, 2014; 210(11):1723-33.

625 66 Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UM, Zhong X, et al. Temporal Dynamics
626 of the Human Vaginal Microbiota. *Sci Transl Med*, 2012; 4(132):132-52.

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

Supporting information

642

S1 Fig. Sequências nucleotídicas dos *Primers Forward e Reverse* utilizadas para a construção das bibliotecas de *Amplicons* do Gene 16S rRNA

Nome dos Primers Forward	Sequência dos Primers Forward	Adaptador PGM A	Sequência dos Barcodes	Sequência dos Primers 16S rRNA
A1MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCACCTTCGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTCCACTTCGCGAT	GAGTTGATCCTGGCTCAG
A2MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGACAATGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGGACAATGGCGAT	GAGTTGATCCTGGCTCAG
A3MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAATTGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGGCAATTGCGAT	GAGTTGATCCTGGCTCAG
A4MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGAGACGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTCGAGACGCGAT	GAGTTGATCCTGGCTCAG
A5MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGAGAATCGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CCGGAGAATCGCGAT	GAGTTGATCCTGGCTCAG
A6MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGCAACGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCTGGCAACGGCGAT	GAGTTGATCCTGGCTCAG
A7MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCAATTGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTCAATTGGCGAT	GAGTTGATCCTGGCTCAG
A8MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGAAGGCAGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGAAGGCAGGCGAT	GAGTTGATCCTGGCTCAG
A9MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTGCCATTTCGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CCTGCCATTTCGCGAT	GAGTTGATCCTGGCTCAG
A10MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAACCCAGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CTAACCCAGGCGAT	GAGTTGATCCTGGCTCAG
Nome dos Primers Reverse	Sequência dos Primers Reverse	Adaptador PGM P1	Sequência dos Barcodes	Sequência dos Primers 16S rRNA
P11MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTCACCTTCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	TTCCACTTCGCGAT	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P12MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTCCTGCTTCACGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	TTCTGCTTCACGAT	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P13MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCTGCCATTTCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	CCTGCCATTTCGCGAT	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P14MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAGCCAATTTCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	CAGCCAATTTCGAT	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P15MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTGGCAATCCTCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	CTGGCAATCCTCGAT	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P16MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTAGGAACCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	CTAGGAACCGCGAT	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P17MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCTGAATCTCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	TCCTGAATCTCGAT	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P18MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGGAAGAACCTCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	CGGAAGAACCTCGAT	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P19MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCTAGAACACGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	TCCTAGAACACGAT	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P110MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCGGAGAATCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	CCGGAGAATCGCGAT	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT

ARTIGO 3: “Perfil de mulheres para um estudo de diversidade da microbiota vaginal”. Este artigo será submetido à revista **Cadernos de Saúde Pública** e explora os 1º e 2º objetivos específicos desta Tese. O artigo é apresentado de acordo com as normas solicitadas pela revista.

PERFIL DE MULHERES PARA UM ESTUDO DE DIVERSIDADE DA MICROBIOTA VAGINAL

Évelyn Costa-Lira^{1,2*}

Gleice Jane Sena Cruz³

Spartaco Astolfi-Filho⁴

Cristina Maria Borborema Santos^{2,5}

Trabalho realizado na Universidade Federal do Amazonas - UFAM – Manaus (AM), Brasil.

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

²Laboratório de Diagnóstico Molecular, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

³Departamento de Planejamento, Secretaria Municipal de Saúde de Manaus

⁴Laboratório Tecnologias do DNA, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

⁵Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

Conflito de interesses: não há.

Correspondência

*Évelyn Costa Lira

Laboratório de Diagnóstico Molecular, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Coroado I, CEP 69080–900, Manaus, Amazonas, Brazil

Phone: 55 (92) 99128 6357

E-mail: costa_eve@yahoo.com.br

RESUMO

OBJETIVO: caracterizar o perfil socioeconômico, clínico e molecular de um grupo de mulheres que participaram de um estudo de diversidade microbiana e identificar possíveis fatores de risco associados a alta incidência lesões pré-malignas e malignas do colo do útero na região Norte, como embasamento para futuras medidas nas ações de prevenção e combate a este tipo de câncer. **MÉTODOS:** As mulheres que concordaram em participar do estudo responderam a um questionário padronizado, a partir do qual, foram avaliadas informações como idade, procedência, estado civil, nível de escolaridade, renda familiar, primeira relação sexual, primeira gravidez, número de abortos, número de gestações através de parto normal ou cesáreo, uso de métodos contraceptivos, hábito de fumar, assim também como o número de parceiros sexuais. Foi realizada a análise da significância de diferença de proporções e avaliada a existência ou não de associação entre as variáveis qualitativas utilizando-se o Teste Qui-Quadrado de Pearson (χ^2) e/ou o Teste Exato de Fisher. Para as variáveis quantitativas foi aplicado o teste Kruskal-Wallis. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5% com um intervalo de confiança de 95%. Todas as análises foram feitas através dos softwares R 2.9.0. **RESULTADOS:** Foi possível realizar a composição dos quatro grupos distintos propostos para a exploração da diversidade bacteriana, a saber: Normal, Candida, Vaginose e Lesão. Além disso, foi possível identificar associação de fatores de risco associados lesões pré-malignas e malignas do colo do útero entre os grupos como o número elevado de parceiros sexuais ($p=0.01599$), a multiparidade ($p<0.0001$) e a presença de Papilomavírus Humano ($p <0.0001$), *Chlamidia trachomatis* ($p=0.001442$) e *Trichomonas vaginalis* ($p=0.000571$). Mesmo sem valores significativos quando comparados entre os grupos, a idade precoce da primeira relação sexual ($p=0.6349$). **CONCLUSÕES:** Neste estudo pudemos confirmar como fatores de risco para lesões pré-malignas e malignas do colo do útero, o elevado número de parceiros sexuais, a multiparidade e a infecção pelo Papillomavirus Humano.

DESCRITORES: Fatores de risco, patógenos sexualmente transmissíveis, câncer cervical, diversidade microbiana.

ABSTRACT

OBJECTIVE: to characterize the socioeconomic clinical and molecular profile of a group of women who participated of microbial diversity study and to identify possible risk factors associated to a high incidence of pre-malignant lesions of the cervix in the North region.

METHODS: the women who agreed to participate in the study answered a standardized questionnaire from which information such as age, origin, marital status, education level, family income, first sexual intercourse, first pregnancy, number of abortions, number of gestations through normal or cesarian birth, use of contraceptive methods, smoking, as wich a number of sex partners. The analysis of the significance of difference of proportions was performed and the existence or not of association between the qualitative variable was evaluated using the Chi-square Test of Pearson (X²) and/or Fischer's exact test. For the quantitative variables, the Kruskal-Wallis test was applied. the level of significance used in the tests was 5% with a confidence interval of 95%. All analyzes were performed using software R.2.9.0. **RESULTS:** it was possible to perform the composition of the four distinct groups proposed for the exploration of bacterial diversity, namely: Normal, Candida, Vaginosis, Injury. In addition, it was possible to identify the association of risk factors associated with pre-malignant lesions of the cervix among the groups, such as the high number of sexual partners (p=0.02599), the multiparity (p<0.0001) and the presence of the Human Papillomavirus (p <0.0001), *Chlamydia trachomatis* (p=0.001442) and *Trichomonas vaginalis* (p=0.000571). Even without significant values when comparing between groups, the early age of the first sexual intercourse (p = 0.6349). **CONCLUSIONS:** In this study we can confirm as risk factors for injuries pre-malignant and malignant diseases of the cervix, the high number of sexual partners, multiparity and Human Papillomavirus infection.

DESCRIPTORS: Risk factors, sexually transmitted pathogens, cervical cancer, microbial diversity

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres do mundo inteiro, com incidência de 528 000 novos casos e mortalidade de 266 000 mulheres por ano, tem 70% dos novos casos ocorrendo nos países em desenvolvimento¹.

As lesões intra-epiteliais escamosas (*squamous intra-epithelial lesions* – SIL) são lesões precursoras do câncer cervical e são classificadas, dependendo do grau de perda da diferenciação epitelial, em baixo grau (*low squamous intra-epithelial lesions* – LSIL) ou alto grau (*high squamous intra-epithelial lesions* – HSIL) e, geralmente, provocam alterações morfológicas características, detectáveis pela citologia dos raspados cérvico-vaginais e histopatologia². A infecção causada pelo HPV é considerada uma condição necessária tanto para o desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas do colo do útero quanto para a progressão de lesões para o câncer cervical. No entanto, sendo o câncer uma doença multifatorial, fatores genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos podem estar envolvidos adicionalmente à infecção pelo HPV^{3,4}.

Dessa forma, co-fatores ambientais, tais como o uso de contraceptivos orais, tabagismo, o número de parceiros sexuais, a multiparidade e a presença de outras infecções sexualmente transmissíveis (IST); co-fatores virais, os quais dizem respeito à infecção por tipos oncogênicos de HPV, co-infecção com outros tipos de HPV ou variantes destes; e co-fatores do hospedeiro incluindo hormônios endógenos, fatores genéticos e relacionados à resposta imune têm sido associados e explorados ao longo dos anos por diversos estudos⁴⁻⁶. Alguns desses fatores também são pontados como influenciadores da microbiota vaginal, já que se encontram associados a diminuição de *Lactobacillus* spp.⁷⁻⁹. E, neste contexto, a presença de patógenos causadores de outras IST, como herpes genital, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e o HIV ganha destaque nessa busca por respostas relacionadas à progressão maligna¹⁰.

A microbiota humana, compreendida por microrganismos que incluem bactérias, fungos, vírus e protozoários, exerce papel importantíssimo para a manutenção da homeostase vaginal e prevenção da colonização por microrganismos patogênicos, mas os mecanismos pelos quais exercem essa influência ainda não são tão bem definidos. No entanto, contribuem para a fisiologia do hospedeiro podendo existir variações interindividuais ou entre indivíduos de acordo com o sexo, a idade, dieta, fatores ambientais como o pH, a umidade, a temperatura, a disponibilidade de nutrientes, e estados patogênicos¹¹⁻¹⁴.

O câncer cervical é o mais incidente na região Norte (23/100.000). Essa situação difere de todas as outras regiões brasileiras em que o câncer de mama é o mais incidente⁴. A tentativa de entender a razão dessa diferença nos levou a explorar a comunidade microbiana vaginal encontrada em condições distintas, a saber: microbiota sem evidências de qualquer sinal, sintoma ou desordem urogenital; microbiota apresentando candidose vulvovaginal; microbiota apresentando vaginose bacteriana e microbiota apresentando lesões pré-malignas do colo do útero.

Diante do exposto e como parte do projeto de diversidade microbiana no trato genital feminino, este estudo teve como principal objetivo a caracterização socioeconômica, clínica e molecular para a identificação de possíveis fatores de risco associados a alta incidência do câncer cervical na região Norte, como embasamento para futuras medidas nas ações de prevenção e combate a este tipo de câncer.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo do tipo transversal, descritivo que teve como alvo mulheres residentes no estado do Amazonas (AM) há, pelo menos, dois anos, que frequentaram o Serviço de ginecologia das Unidades Básicas de Saúde Leonor Mendonça de Freitas, O 08 e Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON-AM), centro de referência na rede pública para mulheres que apresentam lesões pré-malignas e malignas do colo do útero, localizadas na zona oeste da cidade de Manaus (AM) no período entre outubro de 2013 e abril de 2014.

Os critérios de exclusão foram: gravidez, menstruação, diabetes mellitus, conização ou histerectomia total, terapia de reposição hormonal, uso de duchas vaginais higiênicas, uso de antibióticos, antimicrobianos e/ou antifúngicos (oral ou por aplicação tópica na área vulvar) nos quarenta e cinco (45) dias antecedentes à coleta, mulheres menopausadas.

No momento da coleta para a realização do exame preventivo foram realizados o Teste de Whiff e a medição do pH, utilizando fitas indicadoras de pH (Merck & Co, Inc., USA). O status vaginose bacteriana (VB) foi avaliado em todas as participantes do estudo utilizando os critérios clínicos de Amsel et al.¹⁵ e as participantes que preencheram três ou mais dos seguintes critérios foram clinicamente diagnosticados com VB: pH vaginal elevado ($\geq 4,5$), corrimento vaginal homogêneo, liberação de um odor de amina de peixe após a adição de solução de hidróxido de potássio a 10% no fluido vaginal (teste de "Whiff") e/ou a ausência de lactobacilos na citologia oncótica. A presença de candidose vulvovaginal (CVV) foi diagnosticada através

da detecção microscópica de números densos de células de levedura no esfregaço citopatológico. A presença de lesões foi diagnosticada com exame citopatológico e confirmada pelo colposcópico e histopatológico.

A partir das informações clínicas, laboratoriais e moleculares, as mulheres participantes do estudo foram divididas em quatro grupos distintos: I. sem evidências de qualquer sinal, sintoma ou desordem urogenital; II. apresentando CVV; III. apresentando VB; e IV. apresentando lesões pré-malignas do colo do útero.

Das 187 mulheres que aceitaram participar deste estudo (140 mulheres nas Unidades Básicas de Saúde Leonor Mendonça de Freitas e O 08 e 47 atendidas na FCECON), apenas 172 puderam ser categorizadas. Os casos de mulheres que apresentaram resultado citopatológico positivo para lesão pré-maligna do colo do útero tiveram que ser excluídos dos grupos de estudo, já que não se encaixavam no grupo “Normal” e nem podiam ser consideradas para o grupo “Lesão” por não possuírem os exames histológico e colposcópico, confirmatórios para a composição deste grupo. Além disso, mulheres que apresentaram características mistas, como VB e CVV, também foram excluídas.

Essas mulheres foram convidadas a participar do estudo e receberam explicações quanto aos objetivos, benefícios, riscos da pesquisa, confidencialidade dos registros e, as que concordaram em participar, responderam a um questionário através do qual foi possível traçar o perfil socioeconômico da população de estudo. A partir deste questionário, foram avaliadas informações como idade, procedência, estado civil, nível de escolaridade, renda familiar, primeira relação sexual, primeira gravidez, número de abortos, número de gestações através de parto normal ou cesáreo, uso de métodos contraceptivos, hábito de fumar, assim também como o número de parceiros sexuais.

A análise da significância de diferença de proporções e posterior avaliação de existência ou não de associação entre as variáveis qualitativas foi realizada utilizando-se o Teste Qui-Quadrado de Pearson (χ^2) com simulação do p-valor e/ou o Teste Exato de Fisher, para os casos em que a frequência esperada fosse inferior a cinco ($p < 0,05$). Para as variáveis quantitativas foi aplicado o teste Kruskal-Wallis. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5% com um intervalo de confiança de 95%. Todas as análises foram feitas através dos softwares¹⁶.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) (CAAE n. 12240113.8.000.5020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O levantamento das informações referentes à procedência e residência das 187 mulheres que compuseram a população de estudo, demonstrou que 78,07% (146/187) delas nasceram no Amazonas e 95,72% (179/187) moram na capital há mais de dois anos.

O Instituto Nacional do Câncer¹⁷ preconiza o exame citopatológico (preventivo) como o método de rastreamento do câncer cervical, obedecendo um intervalo de três anos após dois resultados negativos (com intervalos de um ano) em mulheres sexualmente ativas com idade entre 25-64 anos de idade. As mulheres participantes deste estudo demonstraram uma média de idade de 32,59 anos (DP \pm 8,43). A idade mínima foi de 16 anos e a idade máxima de 50 anos. Nessa faixa etária, as mulheres estão expostas à infecção pelo HPV.

Dados do perfil clínico das mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde Leonor Mendonça de Freitas e O 08 demonstraram que 96,43% (135/140) tiveram resultado citopatológico inflamatório com negatividade para a presença de neoplasias, no entanto, 2,14% (3/140) dessas mulheres foram excluídas por não possuírem material suficiente para a realização do preventivo e 1,42% (2/140) por apresentarem positividade para a presença de neoplasias resultado. Todas as mulheres atendidas no FCECON apresentaram alteração nesse mesmo exame e, após serem submetidas ao exame histopatológico e colposcópico, apresentaram resultados confirmatórios para lesões pré-malignas do colo do útero do tipo HSIL.

A partir das informações clínicas, laboratoriais (citopatológico e histopatológico, no caso das mulheres com lesão) e moleculares (diagnóstico molecular de HPV, TV e CT, conforme descrito em Costa-Lira¹⁷), foi possível dividir as mulheres participantes do estudo em quatro grupos bem distintos e caracterizados: I. Normal: composto por 40 mulheres sem evidências de qualquer sinal, sintoma ou desordem urogenital; II. composto por 33 mulheres apresentando CVV; III. composto por 31 mulheres apresentando VB; e IV. composto por 44 mulheres apresentando lesões pré-malignas do colo do útero (HSIL).

Os resultados comparativos entre os grupos de estudo realizados para a verificação da existência de associação entre os fatores sócio-econômicos-culturais e clínicos demonstraram que houve uma concentração na faixa etária de 31-40 anos entre as mulheres que compuseram os grupos de estudo, demonstrando existir uma cobertura pelo rastreamento do câncer cervical (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação das variáveis socioeconômicas entre os grupos de estudo Normal, Candida, Vaginose e Lesão

VARIÁVEIS	Normal		Candida		Vaginose		Lesão		P - Valor
	f	f (%)	f	f (%)	f	f (%)	f	f (%)	
Faixa Etária									
16 - 20 anos	5	10,20%	5	12,82%	10	26,32%	2	4,26%	0.1214
21 - 30 anos	15	30,61%	12	30,77%	13	34,21%	10	21,28%	
31 - 40 anos	21	42,86%	15	38,46%	10	26,32%	24	51,06%	
41 - 50 anos	8	16,33%	7	17,95%	5	13,16%	11	23,40%	
Estado civil									
Solteira	18	36,73%	16	40,00%	20	54,05%	9	19,57%	0.004498
União Estável	14	28,57%	12	30,00%	8	21,62%	20	43,48%	
Casada	17	34,69%	12	0,00%	9	24,32%	12	26,09%	
Divorciada/Separada	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	5	10,87%	
Escolaridade									
Ensino Fundamental Incompleto	2	26,53%	6	16,22%	5	13,89%	9	19,15%	0.007496
Ensino Fundamental Completo	13	4,08%	1	2,70%	2	5,56%	12	25,53%	
Ensino Médio Incompleto	2	44,90%	21	56,76%	21	58,33%	19	40,43%	
Ensino Médio Completo	22	4,08%	0	0,00%	3	8,33%	3	6,38%	
Ensino Superior Incompleto	2	12,24%	4	10,81%	4	11,11%	1	2,13%	
Ensino Superior Completo	6	4,08%	5	13,51%	1	2,78%	3	6,38%	
Curso Profissionalizante	2	4,08%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	
Renda Familiar									
Até 1 salário mínimo	25	54,35%	18	51,43%	25	73,53%	21	44,68%	0.1489
De 2 a 4 salários mínimos	19	41,30%	17	48,57%	9	26,47%	24	51,06%	
De 5 a 6 salários mínimos	2	4,35%	0	0,00%	0	0,00%	1	2,13%	
Acima de 6 salários mínimos	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	2,13%	

P-Valor: Teste Qui-Quadrado; Teste Exato de Fischer

Além desses resultados, pudemos observar valores significativos obtidos para estado civil ($p=0.004498$) e escolaridade ($p=0.007496$), mostrando uma concentração maior de mulheres que afirmaram estar casadas ou em uma união estável no grupo Lesão e de mulheres solteiras no grupo Vaginose.

O estado civil pode ser considerado um fator determinante de risco, se for levado em consideração a maior exposição que essas mulheres têm aos patógenos sexualmente transmissíveis, uma vez que não precisariam fazer uso de preservativos durante a relação sexual. Com relação à Escolaridade, foi possível observar que o grupo “Normal” foi composto em sua maioria por mulheres que relataram ter terminado o 2º grau, ao contrário do que foi observado para as mulheres dos grupos “Candida”, “Vaginose” e “Lesão”.

Mesmo que os dados nos levem a crer numa possível falta de acesso à informação, o que não acreditamos que seja de fato, uma explicação plausível caberia à associação dessa

informação com o fato de que a infecção pelo HPV seja muito comum entre as mulheres sexualmente ativas, no entanto, a maioria é transitória e, apenas algumas mulheres infectadas pelo vírus desenvolverão algum tipo SIL e, quando não tratadas, desenvolverão para o câncer cervical⁴. Além disso, de acordo com o INCA¹⁸ o exame realizado por mulheres menores de 25 anos são menos eficientes do que em mulheres maduras por conta da baixa incidência do câncer cervical nessa faixa etária.

A Tabela 2, descreve as médias obtidas a partir do valor do pH medido durante as coletas e, como pode ser observado, houve diferença significativa para os valores de pH2 (ectocérvice) e pH3 (fundo de saco), demonstrando que esses valores são maiores para o grupo Vaginose. O uso regular de contraceptivos orais, por exemplo, pode provocar acúmulo de glicogênio no epitélio cervical e alteração do pH local¹⁹. Alguns grupos de estudo têm relatado que as médias de pH vaginal em mulheres negras (4,7) e hispânicas (5) são mais altas quando comparadas às médias encontradas em mulheres caucasianas (4,2) e asiáticas (4,4), demonstrando que fatores do hospedeiro podem ter um papel importante na determinação da composição e estrutura de sua comunidade microbiana.

Tabela 2: Comparação de variáveis relativas ao comportamento sexual e pH entre os grupos de estudo

Variáveis	Normal	Candida	Vaginose	Lesão	P-Valor
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
<i>pH1 (Endocérvice)</i>	7,07 ± 1,43	7,71 ± 1,29	7,95 ± 1,35	7,68 ± 0,72	0.07636
<i>pH2 (Ectocérvice)</i>	5,88 ± 1,24	5,81 ± 1,11	6,33 ± 1,067	5,63 ± 1,12	0.02628
<i>pH3 (Fundo de Saco)</i>	5,42 ± 1,07	5,04 ± 0,83	5,96 ± 1,09	5,56 ± 1,19	0.00639
<i>Idade da 1ª Relação Sexual</i>	16,45 ± 2,64	16,79 ± 3,09	16,22 ± 2,44	15,89 ± 2,03	0.6349
<i>Número de gestações</i>	2,33 ± 1,45	2,40 ± 1,04	2,88 ± 1,50	4,04 ± 1,85	< 0.0001
<i>Número de abortos</i>	1,45 ± 0,69	1,12 ± 0,35	1,36 ± 0,50	1,636 ± 0,85	0.3807
<i>Número de partos normais</i>	1,72 ± 1,307	1,90 ± 0,92	2,429 ± 1,28	3,216 ± 1,47	< 0.0001
<i>Número de partos cesários</i>	1,67 ± 0,88	1,39 ± 0,61	1,86 ± 1,29	1,47 ± 0,64	0.7506

P-Valor: Teste Qui-Quadrado; Teste de Kruskal-Wallis

Estes resultados na maioria das vezes estão associados à microbiota autóctone, ou seja, a microbiota constituída por microrganismos relativamente fixos ou que são encontrados com regularidade em determinada área, podendo sofrer ou não alterações. Estes achados vão de encontro aos parâmetros tradicionalmente convencionados e associados à microbiota vaginal saudável (pH <4,5)²⁰⁻²².

Ainda com relação às variáveis clínicas demonstradas na Tabela 2, foi possível observar p-valores significativos para as variáveis número de gestações ($p < 0.0001$) e número de partos

normais ($p < 0.0001$), demonstrando que 84,30% (145/172) das mulheres relataram já ter engravidado pelo menos uma vez na vida, 46,81% já sofreram algum aborto e 78,72% tiveram partos normais, sendo as maiores médias encontradas no grupo “Lesão”.

A multiparidade é associada a manutenção prolongada da zona de transformação na ectocérvice ou mesmo a alterações hormonais como níveis aumentados de estrogênio e progesterona, resultados esses de acordo com os relatados na literatura²³. Nosso estudo não encontrou relação significativa em relação à idade da primeira relação sexual, mas chama-se a atenção para o resultado em que se identifica a idade média encontrada para este fator ($15,89 \pm 2,03$).

Observa-se a existência de uma população vulnerável, pelo início da vida sexual precoce, além disso, a cérvice ainda não se apresenta completamente formada e os níveis hormonais ainda se encontram desestabilizados, o que as deixa cada vez mais perto de agravos relacionados à saúde reprodutiva e sexual^{24, 25}.

Quando analisadas as variáveis clínicas qualitativas (Tabela 3) observou-se que apenas os valores de p obtidos para as variáveis “Uso de contraceptivos” ($p=0.03097$), com maior concentração de uso entre as mulheres do grupo “lesão” (78,72%) e “Número de parceiros sexuais” ($p=0.01599$). O uso prolongado de contraceptivos orais poderia promover a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro e estimular a transcrição dos genes E6 e E7 envolvidos na carcinogênese, influenciando assim, a progressão da infecção pelo HPV, pelo fato de expandir a zona de transformação, levando o tecido à exposição para a agressão do HPV²⁶. No entanto, vale a pena ressaltar que as informações relatadas pelas mulheres quanto ao método contraceptivo utilizado, demonstram que essas mulheres fizeram uso do preservativo como método contraceptivo, dado esse que pode nos levar a considerar até mesmo “o mau uso do preservativo”, já que este pode ser colocado a qualquer momento durante a relação, aumentando assim, a exposição dessas mulheres à patógenos sexualmente transmissíveis, incluindo o HPV.

As mulheres que tiveram de três a dez parceiros sexuais apresentaram Candidose, vaginose bacteriana e/ou lesões precursoras do câncer cervical, corroborando o embasamento científico quanto à facilidade de transmissão de patógenos e/ou facilitação para um estado anormal da microbiota vaginal.

O número de parceiros sexuais, assim como a presença de outras infecções sexualmente transmissíveis são destacados como fatores circunstanciais e não causais para o desenvolvimento do câncer cervical, já que trariam uma exposição à infecção pelo HPV ou à infecção causada por quaisquer outros patógenos que, por condição, levariam a uma facilitação

para a integração do DNA viral e consequente desenvolvimento de lesões precursoras do colo do útero^{27, 28}.

Tabela 3: Comparação das variáveis clínicas qualitativas entre os grupos de estudo

Variáveis	Normal		Candida		Vaginose		Lesão		P-Valor
	f	f (%)	f	f (%)	f	f (%)	f	f (%)	
Uso de Contraceptivo									
Não	21	43,75%	17	43,59%	17	44,74%	9	19,15%	0.03097
Sim	27	56,25%	22	56,41%	21	55,26%	37	78,72%	
Às vezes	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	2,13%	
Método Contraceptivo									
Contraceptivo Oral	2	7,14%	3	15,00%	3	14,29%	7	17,07%	0.2859
Anticoncepcional Injetável (mensal/trimestral)	4	14,28%	7	35,00%	7	33,33%	8	19,51%	
Laqueadura	8	28,57%	3	15,00%	3	14,29%	12	29,27%	
DIU	1	3,57%	0	0,00%	2	9,52%	0	0,00%	
Preservativo	13	46,43%	7	35,00%	6	28,57%	14	34,15%	
Hábito de Fumar									
Não	34	73,91%	31	83,78%	26	72,22%	32	68,09%	0.5406
Sim	4	8,70%	1	2,70%	4	11,11%	2	4,26%	
Fumou no passado	8	17,39%	5	13,51%	6	16,67%	13	27,66%	
Número de parceiros sexuais									
Um	16	34,04%	9	23,68%	6	15,79%	4	8,51%	0.01599
Dois	5	10,64%	8	21,05%	6	15,79%	7	14,89%	
Três	11	23,40%	6	15,79%	14	36,84%	12	25,53%	
Quatro	6	12,77%	6	15,79%	3	7,89%	3	6,38%	
Cinco a Dez	9	19,15%	9	23,68%	9	23,68%	17	36,17%	
Onze a Vinte	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	4	8,51%	
Doenças Sexualmente Transmissíveis									
Não	40	85,11%	33	91,67%	35	92,11%	37	78,72%	0.4175
Sim	7	14,89%	3	8,33%	3	7,89%	10	21,28%	

P-valor: Teste Qui-Quadrado; Teste Exato de Fischer

Conforme os dados relatados, não houve significância quando considerado o fator “hábito de fumar”, no entanto, chama-se a atenção para o fato de que 27,66% (13/47) das mulheres componentes do grupo “Lesão” relataram este hábito no passado. O tabagismo é considerado fator de risco para o desenvolvimento de lesões em câncer cervical, devido ao comprometimento de uma resposta imunológica local, já que o tabaco pode ser encontrado no muco cervical e causar danos diretamente ao DNA. Além disso, ele é apontado como responsável pela diminuição do número das células de Langerhans, que possuem papel de defesa do tecido epitelial, facilitando assim a instalação de lesões virais precursoras do câncer²⁸⁻³³.

Foram observados ainda *p*-valores significativos em relação às variáveis, HPV (*p*< 0.0001), TV (*p* =0.001442) e CT (0.000571) entre os grupos de estudo (Tabela 5). A presença do HPV foi detectada em 93,62% (44/47) das mulheres do grupo “Lesão”, o TV foi detectado

em 27,78% (10/40) das mulheres do grupo “Candida” e o CT foi detectado em 15,79% (6/38) das mulheres do grupo “Vaginose”, de acordo com os resultados obtidos em Costa-Lira et al. (2017).

Tabela 4: Comparação das variáveis referentes ao diagnóstico molecular entre os grupos de estudo

Variáveis	Normal		Candida		Vaginose		Lesão		P-Valor
	n	%	n	%	n	%	n	%	
HPV									
Negativo	34	69,39%	23	63,89%	25	65,79%	3	6,38%	< 0.0001
Positivo	15	30,61%	17	47,22%	13	34,21%	44	93,62%	
TV									
Negativo	42	85,71%	30	83,33%	33	86,84%	47	100,00%	0.001442
Positivo	7	14,29%	10	27,78%	5	13,16%	0	0,00%	
CT									
Negativo	49	100,00%	36	100,00%	32	84,21%	47	100,00%	0.000571
Positivo	0	0,00%	4	11,11%	6	15,79%	0	0,00%	

P-valor: Teste Qui-Quadrado; Teste Exato de Fischer

Com relação à presença do HPV, o resultado encontrado era esperado para o grupo “Lesão”, já que, para desenvolver uma lesão precursora do câncer cervical, necessariamente precisa haver a presença deste patógeno naquele ambiente. Não foi encontrada relação entre as lesões com a presença de TV e CT, no entanto, podemos embasar ao fato desta presença ser relacionada ao desenvolvimento da lesão, levando a crer que, provavelmente, a presença desses patógenos pode auxiliar no aumento de mulheres com lesões daqui a alguns anos.

CONCLUSÃO

Neste estudo, através da caracterização socioeconômica, clínica e molecular foi possível compor quatro grupos distintos para a exploração da diversidade bacteriana, a saber: Normal, Candida, Vaginose e Lesão.

Neste estudo podemos confirmar como fatores de risco para lesões pré-malignas e malignas do colo do útero, o elevado número de parceiros sexuais, a multiparidade e a infecção pelo Papillomavirus Humano.

A teoria mais aceita para a explicação do aparecimento do câncer cervical continua sendo relacionada à transmissão sexual, ou seja, ao comportamento sexual³⁴. A realização periódica do exame citopatológico continua sendo a estratégia mais adotada para o rastreamento do câncer cervical em todo o mundo³⁵. Sozinha pode se demonstrar ineficiente, mas quando combinada ao conhecimento da diversidade microbiana encontrada ali e a identificação dos

fatores de risco, pode dar suporte para a redução das taxas de mortalidade que são causadas por este tipo de câncer. No Brasil, ainda não há controle das mulheres que realizam os exames citopatológicos e nem a periodicidade com que o fazem, o que pode refletir no descontrole das medidas e ações tomadas em prol dessa prevenção.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro de parte deste estudo URL: <http://www.fapeam.am.gov.br>

REFERÊNCIAS

1. IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **World Cancer Report**. Lyon, 2014, 632 p.
 2. Wolschick NM, Consolaro MEL, Suzuki LE, Boer CG. Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. *RBAC*, 2007; 39(2):123-129.
 3. Psyrris A, DIMAIO, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008; 5:24-31.
 4. INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 122p., 2015.
 5. Muñoz N, Castellsagué X, González AB, GISSMANN L. Chapter 1: HPV in etiology of human cancer. *Vaccine*, 2006; 24S3:S31-S310.
 6. Smith JS, Bosetti C, Muñoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-neto J, Meijer CJLM, van den Brule AJ, Franceschi S, Peeling RW, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer*, 2004; 111:431-39.
 7. Cherpes TL, Hillier SL, Meyn LA, Busch JL, Krohn MA. A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex. Transm. Dis.*, v.35, p.78-83, 2008.
 8. Ryckman KK, Simhan HN, Krohn MA, Williams SM. Predicting risk of bacterial vaginosis, the role of race, smoking and corticotropin-releasing hormone-related genes. *Mol. Hum. Reprod.*, 2009; 15:131-137.
-

9. Digiulio DB, Callahan BJ, Mcmurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, Sun CL, Goltsman DS, Wong RJ, Shaw G, Stevenson DK, Holmes SP. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2015; 112:11060–11065.
 10. Stensen S, Kjaer SK, Jensen SM, Frederiksen K, Junge J, Iftner T, Munk C. Factors associated with type-specific persistence of high-risk human papillomavirus infection: A population-based study. *Int J Cancer*, 2016; 138:361–368.
 11. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*, 4(11):430-5, 1996.
 12. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 2006; 313(5790): 1126–30.
 13. Dethlefsen L, Mcfall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, 2007; 449:811-818.
 14. Eloe-Fadrosh EA, Rasko DA. The Human Microbiome: From Symbiosis to Pathogenesis. *The Human Microbiome*, 2013; 64:145-63.
 15. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial. *Am J Med*, 1983; 74(1):14-22.
 16. R. Development Core Team. R Foundation for Statistical Computing R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 10 nov 2017.
 17. Costa-Lira E, Jacinto AHVL, Silva LM, Napoleão PFR, Barbosa-Filho RAA, Cruz GJS, Astolfi-Filho S, Borborema-Santos CM. Prevalence of Human Papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, and *Trichomonas vaginalis* infections in Amazonian women with normal and abnormal cytology. *Genetics and Molecular Research*, 2017; 16 (2): gmr16029626.
 18. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro, 2011, 106 p.
 19. Abrahão SB, Mion Jr D. Hypertension and oral contraceptives. *Rer Bras Hipertens*. 2000; 7(4):392-5.
 20. Stevens-Simon C, Jamison J, Mcgregor JA, Douglas JM. Racial variation in vaginal pH among healthy sexually active adolescents. *Sex Transm Dis*, 1994; 21(3):168–172.
 21. Fiscella K, Klebanoff MA. Are racial differences in vaginal pH explained by vaginal flora? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2004; 191(3):747–750.
-

22. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, Mcculle SL, Karlebach, S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CD, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 2011; 108(1):4680-87.
 23. Rubini AMS, Santos JLG, Erdmann AL, Rosa LM. Discursos de Mulheres com Câncer Cervical em Tratamento Braquiterápico: Subsídios Para o Cuidado de Enfermagem. *Revista de Enfermagem da UFSM*, 2012; 2(3):601-609.
 24. Silva MRB, Silva GP. O Conhecimento, Atitudes E Prática Na Prevenção Do Câncer Uterino De Uma Unidade Da Zona Oeste Rio De Janeiro. *Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental online*, 2012; 4(3):2483-92.
 25. Duarte SJH, Matos KF, Oliveira PJM, Matsumoto AH, Morita, LHM. Fatores de Risco Para Câncer Cervical em Mulheres Assistidas Por Uma Equipe de Saúde da Família em Cuiabá, MT, Brasil. *Ciencia Y Enfermeria*, 2011; XVII(1): 71-80.
 26. São Bento PAS, Telles AC, Suzarte CTS, Moraes LEO. O Câncer do Colo do Útero Como Fantasma Resistente a Prevenção Primária a Detecção Precoce. *Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online*, 2010; 2(2): 776-786.
 27. Castellsague X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003; 31:20-8.
 28. Melo SCCS, Prates L, Carvalho MDB, Marcon SS, Peloso SM. Alterações Citopatológicas e Fatores de Risco Para a Ocorrência do Câncer de Colo Uterino. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, 2009; 30(4): 602-8.
 29. Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Cancer Research* 1997; 71:321-25.
 30. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13541 women with carcinoma of the cervix and 23017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*, 2006; 118:1481-95.
 31. Anjos SJSB, Vasconcelos CTM, Franco ES, Paulo César de Almeida PC, Pinheiro AKB. Fatores de Risco Para Câncer de Colo do Útero Segundo Resultados de IVA, Citologia e Cervicografia. *Revista Escola de Enfermagem USP São Paulo*, 2010; 44(4): 912-20.
 32. Ferreira MLSM, Galvão MTG. Avaliação do Risco de Câncer de Colo Uterino em Trabalhadoras da Indústria Têxtil. *Ciência Cuidado e Saúde*, 2009; 8(1):86-92.
 33. Barasuol MEC, Schmidt DB. Neoplasia do colo do útero e seus fatores de risco: revisão integrativa. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, 2014; 6(3): 138-153.
-

34. Santos ACS, Varela CDS. Prevenção do câncer de colo uterino: motivos que influenciam a não realização do exame de papanicolaou. *Revista Enfermagem Contemporânea*, 2015; 4(2):179-188.
35. WHO. World Health Organization. Sexually Transmitted Infections (STIs). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>>. Acesso em: 20 out 2017.

6. CONCLUSÕES

6.1. A população deste estudo foi categorizada em quatro grupos distintos e bem definidos: I. Normal; II. Candida; III. Vaginose e IV. Lesão;

6.2. O elevado número de parceiros sexuais, a multiparidade e a infecção pelo HPV foram identificados como possíveis fatores de risco associados a alta incidência de lesões pré-malignas e malignas do colo do útero na região Norte na população estudada;

6.3. Foi diagnosticada, a nível molecular, a presença do HPV em 51,33% (96/187) das mulheres que participaram deste estudo;

6.4. O HPV foi encontrado em 36,42% (51/140), *C. trachomatis* em 17,42% (24/140) e *T. vaginalis* em 8,57% (12/140) das mulheres atendidas nas UBS, havendo co-infecção com *C. trachomatis* em 5,20% (5/140) e com *T. vaginalis* em 4,28% (6/140) dessas mulheres. Entre as mulheres do FCECON, o HPV foi encontrado em 93,61% (44/47) das participantes. Não houve co-infecção entre essas mulheres. O DNA de *N. gonorrhoeae* não foi encontrado em nenhuma das mulheres participantes deste estudo pelo método utilizado.

6.5. Foram identificados os tipos de HPV 6, 16, 18, 31, 33, 52, 53, 54, 58, 59, 61, 62, 66, 70, 72, 81, 82, 82 e 102 entre as participantes deste estudo;

6.6. A partir das amostras cervicais, foi possível a construção de quatro bibliotecas de *amplicons* das regiões V1-V2 do gene 16S rRNA.

6.7. Entre os grupos de estudo, a maior diversidade microbiana foi encontrada entre as mulheres do grupo Vaginose, seguido das mulheres do grupo Lesão. A diversidade entre os grupos Normal e Candida foram muito parecidas;

6.8. Não foi possível a caracterização das espécies bacterianas encontradas neste estudo. Os gêneros identificados, em ordem de abundância, foram: *Lactobacillus*, *Ureaplasma*, *Prevotella*, *Shuttleworthia*, *Atopobium*, *Bradyrhizobium*, *Variovorax*, *Megasphaera* e *Sneathia*;

6.9. Os gêneros comuns aos quatro grupos de estudo foram: *Lactobacillus*, *Atopobium*, *Shuttleworthia*, *Variovorax*, *Prevotella*, *Megasphaera* e *Sneathia*. O gênero *Bradyrhizobium* foi encontrado apenas entre os grupos Normal, Candida e Vaginose;

7.0. O gênero *Ureaplasma* foi encontrado apenas entre os grupos Normal, Candida e Lesão, com expressiva representatividade neste último.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELSAMED, H.; PETERS, J.; BYRNE, G.I. Genetic variation in *Chlamydia trachomatis* and their hosts: impact on disease severity and tissue tropism. **Future Microbiol.**, v.8, p.1129–46, 2013.

AL-DARAJI, W.I.; SMITH, J.H.F. Infection and Cervical Neoplasia: Facts and Fiction. **Int J Clin Exp Pathol**, v.2, p.48-64, 2009.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v.25, p.3389- 3402, 1997.

AMSEL R, TOTTEN PA, SPIEGEL CA, CHEN KC, ESCHENBACH D, HOLMES KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial. **Am J Med**, v.74, n.1, p.14-22, 1983.

ANAHTAR, M.N.; BYRNE, E.H.; DOHERTY, K.E.; BOWMAN, B.A.; YAMAMOTO, H.S.; SOUMILLON, M.; PADAVATTAN, N.; ISMAIL, N.; MOODLEY, A.; SABATINI, M.E.; GHEBREMICHAEL, M.S.; NUSBAUM, C.; HUTTENHOWER, C.; VIRGIN, H.W.; NDUNG’U, T.; DONG, K.L.; WALKER, B.D.; FICHOROVA, R.N.; KWON, D.S. Cervicovaginal Bacteria Are a Major Modulator of Host Inflammatory Responses in the Female Genital Tract. **Immunity**, v.42, p.965–976, 2015.

ANUKAM, K.C.; OSAZUWA, E.O.; AHONKHAI, I; REID, G. 16S rRNA gene sequence and phylogenetic tree of lactobacillus species from the vagina of healthy Nigerian women. **Afr J of Biotechnol**, v.4, n.11, p.1222-1227, 2005.

ANDERSSON A.F.; LINDBERG M.; JAKOBSSON H.; BACKHED F.; NYREN P.; et al. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. **PLoS ONE**, v.3, n.7, p. e2836, 2008.

ATASHILI, J.; POOLE, C.; NDUMBE, P.M.; ADIMORA, A.A.; JENNIFER S. SMITH, J.S. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. **Aids**, v.22, n.12, p.1493–1501, 2008.

BARROS, N.K.S.; ALVES, R.R.F.; CARNEIRO, M.A.S.; RABELO-SANTOS, S.H. O papel da associação das infecções por Papilomavírus humano e *Chlamydia trachomatis* no desenvolvimento do câncer cervical. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.IV, n.2, p.114-118, 2007.

BERG, R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends Microbiol**, v.4, n.11, p.430-5, 1996.

BERNARD, H.U; CHAN, SY.; MANOS, M.M.; ONG, C.K.; VILLA, L.L.; DELIUS, H.; PEYTON, C.L.; BAUER, H.M.; WHEELER, C.M. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis**, v.170, p.1077–85, 1994.

BOSCH F.X.; LORINCZ A.; MUNOZ N.; MEIJER C.J.; SHAH K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol**, v.55, p.244-265, 2002.

BRADFORD, L.L.; RAVEL, J.; BRUNO, V. Understanding Vulvovaginal Candidiasis Through a Community Genomics Approach. **Cur Fungal Infect Rep**, v.7, n.2, p.126-131, 2013.

BRADSHAW, C.S.; TABRIZI, S.N.; FAIRLEY, C.K.; MORTON, A.N.; RUDLAND, E.; GARLAND, S.M. The Association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with Bacterial Vaginosis and Recurrence after Oral Metronidazole Therapy. **J. Infect. Dis.**, v.194, p.828–836, 2010.

BROTMAN, R.M.; GHANEM, K.G.; KLEBANOFF, M.A.; TAHA, T.E.; SCHARFSTEIN, D.O.; ZENILMAN, J.M. The effect of vaginal douching cessation on bacterial vaginosis: a pilot study. **Am J Obstet Gynecol**, v.198, n.628, p.e1–7, 2008.

BROTMAN, R.M. Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective. **J Clin Invest.**, v.1, n.12, p.4610–4617, 2011.

BROTMAN, R.M.; SHARDELL, M.D.; GAJER, P.; TRACY, J.K.; ZENILMAN, J.M.; RAVEL, J.; GRAVITT, P. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. **J Infect Dis**, v.210, n.11, p.1723-33, 2014.

BURD, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, v.16, n. 1 p.1S-17S, 2003.

BURK, R.D.; CHEN, Z.; van DOORSLAER, K. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. **Public Health Genomics**, v.12, p.281-290, 2009.

CAMARA, G.N.N.L.; CRUZ, M.R.; VERAS, V.S.; MARTINS, C.R.F. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas Ciências da Saúde**, v.1, n.1, p.149-158, 2003.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v.7, n.5, p.335-336, 2010a.

CAPORASO, J.G.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, v.26, n.2, p.266-267, 2010b.

CASH, H.L.; WHITHAM, C.V.; CASSIE L. BEHRENDT, C.L.; HOOPER, L.V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. **Science**, v.313, n.5790, p.1126–30, 2006.

CASTELLSAGUE, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v.31, p.20-8, 2003.

CAVALCANTE, V.L.N.; ALDINE T MIRANDA, A.T.; GLENDA MP PORTUGAL, G.M.P. Rastreamento de candidose vaginal durante a prevenção do câncer cérvico-uterino. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, v.17, n.1, p.44-48, 2005.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Fungal Diseases: Genital/Vulvovaginal candidiasis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/genital/index.html>>. Acesso em: 15 nov 2017a.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Sexually Transmitted Diseases Surveillance 2016. National Profile Overview: Chlamydia**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/std/stats16/chlamydia.htm>>. Acesso em: 15 nov 2017b.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Sexually Transmitted Diseases Surveillance 2016. National Profile Overview: Other Sexually Transmitted Diseases**. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/std/stats16/other.html>>. Acesso em: 15 nov 2017c.

CHERPES, T.L.; HILLIER, S.L.; MEYN, L.A.; BUSCH, J.L.; KROHN, M.A. A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. **Sex. Transm. Dis.**, v.35, p.78–83, 2008.

CORSELLO, S.; SPINILLO, A.; OSNENGO, G.; PENNA, C.; GUASCHINO, S.; BELTRAME, A.; BLASI, N.; FESTA, A. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.110, p. 66-72, 2003.

CONTI, C.; MALACRINO, C.; MASTROMARINO, P. Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal lactobacilli. **J Physiol Pharmacol**, v.60, n.6, p.19-26, 2009.

DE SANJOSE, S.; QUINT, W.G.; ALEMANY, L. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncol**, n.11, p.1048-56, 2010.

DETHLEFSEN L.; MCFALL-NGAI M.; RELMAN D.A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, v.449, p.811-818, 2007.

DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; zur HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

DIAS, S.C. Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 373-379, 2004. In: _____. CARVALHO, E.B.S. Estudo da microbiota da rizosfera do guaranazeiro (*Paulinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) pelo Sequenciamento do gene 16S rDNA, Manaus – Amazonas. UFAM, 2015. 79f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, 2015.

DIGIULIO, D.B.; CALLAHAN, B.J.; MCMURDIE, P.J.; COSTELLO, E.K.; LYELL, D.J.; ROBACZEWSKA, A.; SUN, C.L.; GOLTSMAN, D.S.; WONG, R.J.; SHAW, G.; STEVENSON, D.K.; HOLMES, S.P. Temporal and spatial variation of the human microbiota

during pregnancy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.112, p.11060–11065, 2015.

DÖDERLEIN, A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für Puerperalheber. **ZbL Bald**, v.11, p.699, 1892.

DONATI, L.; DI VICO, A.; NUCI, M.; QUAGLIOZZI, L.; SPAGNUOLO, T.; LABIANCA, A.; BRACAGLI, M.; IANNIELLO, F.; CARUSO, A.; PARADISI, G. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. **Arch Gynecol Obstet**, v.281, p.589-600, 2010.

DOORBAR, J. The Papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v.32, p.7-15, 2005.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C.; MURAKAMI, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Rev Med Virol**, v.1, n.2-23, 2016.

DRELL, T.; LILLSAAR, T. et al. Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic Reproductive-age Estonian women. **PloS ONE**, 2013, v.8, n.1, p.1-11, 2013.

ELOE-FADROSH, E.A.; RASKO, D.A. The Human Microbiome: From Symbiosis to Pathogenesis. **The Human Microbiome**, v.64, p.145-63, 2013.

EVANDER, M.; EDLUND, K.; BODÉN, E.; GUSTAFSSON, A.; JONSSON, M.; KARLSSON, R.; RYLANDER, E.; WADELL, G. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.987–992, 1992.

FEERO, W.G.; GUTTMACHER, E. Microbial Genomics and Infectious Disease. **N Engl J Med**, v.365, p.347-57, 2011.

FETTWEIS, J.M.; SERRANO, M.G.; SHETH, N.U.; MAYER, C.M.; GLASCOCK, A.L.; BROOKS, J.P.; JEFFERSON, K.K.; VAGINAL MICROBIOME CONSORTIUM (ADDITIONAL MEMBERS), BUCK, G.A. Species-level classification of the vaginal microbiome. **BMC Genomics**, v.13, Suppl 8, S17, 2012.

FETTWEIS, J.; BROOKS, J.P. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. **Microbiology**, v.160, n.2272–2282, 2014.

FEUERSCHUETTE, O.H.M.; SILVEIRA, S.K.; FEUERSCHUETTE, I.; CORRÊA, T.; GRANDO, L.; TREPANI, A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **Femina**, v.38, n.2, p.1-36, 2010.

FIERER, N.; HAMADY, M.; LAUBER, C.L.; KNIGHT, R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.105, n.46, p.17994-17999, 2008.

FISCELLA, K.; KLEBANOFF, M.A. Are racial differences in vaginal pH explained by vaginal flora? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.191, n.3, p.747–750, 2004.

FORNEY, L.J.; GAJER, P.; WILLIAMS, C.J.; SCHNEIDER, G.M.; KOENIG, S.S.K.; McCULLE, S.L.; KARLEBACH, S.; BROTMAN, R.M.; DAVIS, C.C.; AULT, K.; RAVEL, J. Comparison of self-collected and physician-collected vaginal swabs for microbiome analysis. **J Clin Microbiol**, v.48, n.5, p. 1741-1748, 2010.

FREDRICKS, D.N.; FIEDLER, T.L.; MARRAZZO, J.M. Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. **N Engl J Med**, v.353, n.18, p.1899-1911, 2005.

FREDRICKS, D.N.; FIEDLER, T.L.; THOMAS, K.K.; OAKLEY, B.B.; MARRAZZO, J.M. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, p.3270-3276, 2007.

GAJER, P.; BROTMAN, R.M.; BAI, G.; SAKAMOTO, J.; SCHÜTTE, U.M.E.; ZHONG, X.; KOENIG, S.S.K.; FU, L.; MA, Z.; ZHOU, X.; ABDO, Z.; FORNEY, L.J.; RAVEL, J. Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. **Sci Transl Med**, v.4, n.132, p.132-52, 2012.

GARCÍA-VELASCO, J.A.; MENABRITO, M.; CATALÁN, I.B. What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review. **Reproductive Biomedicine Online**, v.35, n.1, p.103-112, 2017.

GHARTEY, J.P.; SMITH, B.C.; CHEN, Z.; BUCKLEY, N.; Lo, Y.; RATNER, A.J.; HEROLD, B.C.; BURK, R.D. Lactobacillus crispatus Dominant Vaginal Microbiome Is Associated with Inhibitory Activity of Female Genital Tract Secretions against Escherichia coli. **PLoS ONE**, v.9, n.5, p.e96659, 2014.

GHOSH, I.; MANDAL, R.; KUNDU, P.; BISWAS, J. Association of Genital Infections Other Than Human Papillomavirus with Pre-Invasive and Invasive Cervical Neoplasia. **J Clin Diagn Res.**, v.10, n.2, p.XE01-XE06, 2016.

GILL, S.R.; POP, M.; DEBOY, R.T. ECKBURG, P.B.; TURNBAUGH, P.J.; SAMUEL, B.S.; GORDON, J.I.; RELMAN, D.A.; FRASER-LIGGETT, C.M.; NELSON, K.E. Metagenomic analysis of the Human Gut Microbiome. **Science**, v.312, p.1355-1359, 2006.

GIRALDO, P.C.; PASSOS, M.R.L.; BRAVO, R.; VARELLA, R.Q.; CAMPOS, W.N.A.; AMARAL, R.L.; MARUSSI, E. O Frequente desafio do entendimento e do manuseio da vaginose bacteriana. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.19, n.2, p.84-91, 2007.

GOLIJOW, C.D.; ABBA, M.C.; MOURÓN, S.A.; LANGUES, R.B.; DULOUT, F.N.; SMITH, J.S. Chlamydia trachomatis and Human papillomavirus infections cervical disease in Argentine women. **Gynecologic Oncology**, v.96, p.181-186, 2005.

GONZALEZ, A.; CLEMENTE, J.C.; SHADE, A., et al. Our microbial selves: what ecology can teach us. **EMBO Rep**, v.12, n.8, p.775-84, 2011.

GHOSH, I.; MANDAL, R.; KUNDU, P.; BISWAS, J. Association of Genital Infections Other Than Human Papillomavirus with Pre-Invasive and Invasive Cervical Neoplasia. **J Clin Diagn Res.**, v.10, n.2, p.XE01-XE06, 2016.

GOSWAMI, D.; GOSWAMI R.; BANERJEE, U.; DADHWAL, V.; MIGLANI, S.; LATTIF, A.A.; KOCHUPILLAI, N. Pattern of Candida species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.6, p.2336-42, 2006.

GUAN, B.; MAO, T.L.; PANUGANTI, P.K. et al. Mutation and loss of expression of ARID1A in uterine low-grade endometrioid carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v.35, p.625–632, 2011.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v.41, p.95-98, 1999.

HARWICH, M.D.; ALVES, J.M.; BUCK, G.A.; STRAUSS, J.F.; PATTERSON, J.L.; OKI, A.T.; GIRERD, P.H.; JEFFERSON, K.K. Drawing the line between commensal and pathogenic Gardnerella vaginalis through genome analysis and virulence studies. **BMC Genomics**, v.11, p.375, 2010.

HELLBERG, D.; NILSSON, S.; MARDH, P.A. Bacterial vaginosis and smoking. **Int. J. STD AIDS**, v.11, p.603–6, 2000.

HESS, M.; SCZYRBA A.; EGAN, R.; et al., Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, v.331, p.463-67, 2011.

HICKEY, R.J.; ZHOU, X.; PIERSON, J.D.; RAVEL, J.; FORNEY, L.J. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. **Transl Res**, v.160, n.4, p.267-282, 2012.

HMPC. Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. **Nature**, v.13, n.486, p.215-21, 2012.

HUANG, B.; FETTWEIS, J.M.; BROOKS, J.P.; JEFFERSON, K.K.; BUCK, G.A. The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome. **Clin Lab Med**, n.34, p.747–761, 2014.

HUBER J.A.; MARK W.D.B.; MORRISON H.G.; HUSE S.M.; NEAL P.R.; et al. Microbial population structures in the deep marine biosphere. **Science**, v.318, p. 97-100, 2007.

IARC: International Agency for Research on Cancer. **Cervical Cancer**. Disponível em: <<http://screening.iarc.fr/cervicalindex.php>>. Acesso em: 21 jun 2016.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 122p, 2015.

JACKSON, S.T.; MULLINGS, A.M.; RAINFORD, L.; MILLER, A. The epidemiology of mycotic vulvovaginitis and the use of antifungal agents in suspected mycotic vulvovaginitis and its implications for clinical practice. **West Indian Med J**, v.54, n.3, p.192-5, 2005.

JENKINSON H.F.; LAMONT R.J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends Microbiol**, v.113, p.589-595, 2005.

KAUL R.; NAGELKERKE N.J.; KIMANI J.; NGUGI, E.; BWAYO, J.J.; MACDONALD, K.S.; REBBAPRGADA, A.; FONCK, K.; TEMMERMAN, M.; RONALD, A.R.; STEPHEN MOSES, S. and the KIBERA HIV STUDY GROUP. Prevalent herpes simplex virus type 2 infection is associated with altered vaginal flora and an increased susceptibility to multiple sexually transmitted infections. **J Infect Dis**, v.196, p.1692–7, 2007.

KIM, T.K.; THOMAS, S.M.; HO, M.; SHARMA, S.; REICH, C.I.; FRANK, J.A.; YEATER, K.M.; BIGGS, D.R.; NAKAMURA, N.; STUMPF, R.; LEIGH, S.R.; TAPPING, R.I.; BLANKE, S.R.; SLAUCH, J.M.; GASKINS, H.R.; WEISBAUM, J.S.; OLSEN, G.J.; HOYER, L.L.; WILSON, B.A. Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals. **J Clin Microbiol.**, v.47, n.4, p.1181-9, 2009.

LEDERBERG, J.; MCCRAY, A.T. 'Ome Sweet 'Omics - a genealogical treasury of words. **Scientist**, v.15, p.8, 2001.

LEE, J.E.; LEE, S.; LEE, H.; SONG, Y.; KAYOUNG LEE, K.; HAN, M.J.; SUNG, J.; KO, G. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. **PLoS ONE**, v.8, n.5, p.e63514, 2013.

LING, Z.; KONG, J.; LIU, F.; ZHU, H.; CHEN, X.; WANG, Y.; LI, L.; NELSON, K.E.; XIA, Y.; XIANG, C. Molecular analysis of the Diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. **BMC Genomics**, v.11, n.488, p.1-16, 2010.

LIU, M-B.; XU, S-R.; HE, Y.; DENG, G-H.; SHENG, H-F.; HUANG, X-M.; OUYANG, C-Y.; HONG-WEI ZHOU, H-W. Diverse Vaginal Microbiomes in Reproductive-Age Women with Vulvovaginal Candidiasis. **PLoS ONE**, v.8, n.11, p.e79812, 2013.

LOPES, C.M.E.; ALBERTONI, T.A.; YOSHIDA, C.S.; MAZUCHELLI, J.; PERALTA, R.M.; SVIDZINSKI T.I.E. Correlation of candida species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringa, Parana, Brazil. **Rev Iberoam Micol**, v.21, n.4, p.202-5, 2004.

MA, B.; FORNEY, L.J.; RAVEL, J. Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Disease. **Annu Rev Microbiol**, v.66, p.371–389, 2012.

MCMURDIE, P.J.; HOLMES, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS ONE**, v.8, n.4, p.e61217, 2013.

MADICO, G.; QUINN, T. C.; ROMPALO, A.; MCKEE JR, K.T.; GAYDOS, C. A. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.11, p.3205-3210, 1998.

MAHONY, J.B.; LUINSTRA, K.E.; SELLORS, J.W.; CHERNESKY, M.A. Comparison of Plasmid and Chromosome-Based Polymerase Chain Reaction Assays for detecting *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.7, p.1753-1758, 1993.

MANDIC, A.; VUJKOV, T. Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? **Ann Onc**, v.15, p.197-200, 2004.

MANOS, M.M.; TING, Y.; WRIGHT D.K.; LEWIS, A.I.; BROKER, T.R.; WOLINSKY, S.M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v.7, p.209-214, 1989.

MÅRDH, P.A.; RODRIGUES, A.G.; GENÇ, M.; NOVIKOVA, N.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; GUASCHINO, S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. **Int J STD AIDS**, v.13, p.522-39, 2002.

MARSHALL, O.J. *PerlPrimer*: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, n.20, n.15, p.2471-2472, 2004.

MATTILA, H.R.; RIOS, D.; WALKER-SPERLING, V.E.; ROESELERS, G.; NEWTON, I.L. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. **PLoS ONE**, v.7, n.3, p. e32962, 2012.

MITCHELL, C.M.; FREDRICKS, D.N.; WINER, R.L.; KOUTSKY, L. Effect of sexual debut on vaginal microbiota in a cohort of young women. **Obstet Gynecol**, v.120, n.6, p.1306-13, 2012.

MITRA, A.; MACINTYRE, D.A.; LEE, Y.S.; SMITH, A.; MARCHESI, J.R.; LEHNE, B.; BHATIA, R.; LYONS, D.; PARASKEVAIDIS, E.; LI, J.V.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J.K.; BENNETT, P.R.; KYRGIU, M. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. **Scientific Reports**, v.5, n.16865, p.1-11, 2015.

MOODLY, C.A.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v.10, n.8, p.550-60, 2010.

MOREY, M.; FERNANDEZ-MARMIESSE, A.; CASTINEIRAS, D.; FRAGA, J.M.; COUCE, M.L.; COCHO, J.A. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.110, n.1-2, p.3-24, 2013.

MOURÃO, P.H.O.; PAULA PRAZERES MAGALHÃES, P.P.; MENDES, E.N. MICROBIOTA INDÍGENA DE SERES HUMANOS. **Rev Med Minas Gerais**, v.15, n.3, p.177-84, 2005.

MUÑOZ N.; BOSCH F.X.; SANJOSE S. HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.F.; MEIJER, C.J.L.M.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v.348, p.518-527, 2003.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in etiology of human cancer. **Vaccine**, v.24S3, p.S31-S310, 2006.

MUZNY, C.A.; SUNESARA, I.R.; KUMAR, R.; MENA, L.A.; GRISWOLD, M.E.; MARTIN, D.H.; LEFKOWITZ, E.J.; SCHWEBKE, J.R. SWIATLO, E. Characterization of the vaginal

microbiota among sexual risk behavior groups of women with bacterial vaginosis. **PLoS ONE**, v.8, n.11, p.e80254, 2013.

NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, p.297–301, 1991.

OAKLEY, B.B.; FIEDLER, T.L.; MARRAZZO, J.M.; FREDRICKS, D.N. Diversity of Human Vaginal Bacterial Communities and Associations with Clinically Defined Bacterial Vaginosis. **Appl Environ Microbiol**, v.74, n.15, p.4898–4909, 2008.

O'HANLON, D.E.; MOENCH, T.R.; CONE, R.A. Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota. **PLoS ONE**, v.8, n.11, p.e80074, 2013.

ONDERDONK, A.B.; DELANEY, M.L.; FICHOROVA, R.N. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. **Clin Microbiol Rev**, v.29, n.2, p.223-38, 2016.

PATTERSON JL, STULL-LANE A, GIRERD PH.; JEFFERSON, K.K. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. **Microbiology**, v.156, n.Pt2, p.392–9, 2010.

PAAVONEN, J.; EGGERT-KRUSE, W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction. *Human Reproduction Update*, v.5, n.5, p.433-447, 1999.

PELLATI, D.; MYLONAKIS, I.; BERTOLONI, G. et al. Genital tract infection and infertility. **Eur J Obst Gynecol Reprod Bio**, v. 140, p. 3-11, 2008.

PENNA, G.O.; HAJJAR, L.A.; BRAZ, T.M. Gonorréia. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.33, n.5, p.451-464, 2000.

PETROVA, M.I.; van den BROEK, M.; BALZARINI, J.; VANDERLEYDEN, J.; LEBEER, S. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. **FEMS Microbiol Rev**, v.37, n.5, p.762–792, 2013.

PREETHI, V.; MANDAL, J.; HALDER, A.; PARIJA, S.C. Trichomoniasis. An update. **Trop Parasitol.**, v.1, p.73-75, 2011.

PROBIONOV. **The vaginal Microbiota**. Disponível em: <<http://probionov.com>>. Acesso em: 12 jun 2016.

PSYRRI, A.; DIMAIO, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck câncer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 5; p. 24-31, 2008.

PREETHI, V.; MANDAL, J.; HALDER, A.; PARIJA, S.C. Trichomoniasis. An update. **Trop Parasitol.**, v.1, p.73-75, 2011.

R. Development Core Team. **R Foundation for Statistical Computing R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria**. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 10 fev 2015.

RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; SCHNEIDER, G.M.; KOENIG, S.S.K.; MCCULLE, S.L.; KARLEBACH, S.; GORLE, R.; RUSSELL, J.; TACKET, C.O.; BROTMAN, R.M.; DAVIS, C.D.; AULT, K.; PERALTA, L.; FORNEY, L.J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc. Natl. acad. Sci. USA**, v.108, n.1, p.4680-87, 2011.

REES, H. C., GRANT, S., JONES, B., GRANT, W. D. E HEAPHY, S. Detecting cellulose and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles**, n.7, v.5, p.415–421, 2003.

RYCKMAN, K.K.; SIMHAN, H.N.; KROHN, M.A.; WILLIAMS, S.M. Predicting risk of bacterial vaginosis, the role of race, smoking and corticotropin-releasing hormone-related genes. **Mol. Hum. Reprod.**, v.15, p.131–137, 2009.

RIVOIRE, W.A.; CAPP, E.; CORLETA, H.E.; SILVA, I.S.B. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.47, n.2, p.179-84, 2001.

RIVOIRE, W.A.; CORLETA, H.V.E.; BRUM, I.S.; CAPP, E. Biologia molecular do câncer cervical. **Rev Bras Saúde Matern Infant**, v.6, n.4, p.447-451, 2006.

RODRIGUEZ, J.M.; COLLINS MD, SJODEN B, FALSEN E. Characterization of a novel Atopobium isolate from the human vagina: description of Atopobium vaginae sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.49, n.Pt 4, p.1573–1576, 1999.

ROESCH L.F.; FULTHORPE R.R.; RIVA A.; CASELLA G.; HADWIN A.K.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME J**, v.1, p.283-290, 2007.

ROSA, M.I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.26, n.1, p.65-70, 2004.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. *Primer3* on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol Biol**, v.132, p.365-86, 2000.

RYCKMAN, K.K.; SIMHAN, H.N.; KROHN, M.A.; WILLIAMS, S.M. Predicting risk of bacterial vaginosis, the role of race, smoking and corticotropin-releasing hormone-related genes. **Mol. Hum. Reprod.**, v.15, p.131–137, 2009.

SANSCHAGRIN, S.; YERGEAU, E. Next-generation Sequencing of 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons. **J. Vis. Exp**, n.90, v. e51709, p.1-7, 2014.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P.E.; JERONIMO, J.; RODRIGUEZ, A.C.; WACHOLDER, S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v.370, p.890-907, 2007.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v.27, n.6, p.863-864, 2011.

SILVA FILHO, A.M.; LONGATTO FILHO, A. **Colo uterino e vagina: processos inflamatórios – aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos**. Rio de Janeiro: Revinter, 193-200p., 2000.

SIMÕES, J.A.; GIRALDO, P.C. O corrimento vaginal durante a gravidez. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, v.10, n.5, p.20-30, 1998.

SMITH, J.S.; GREEN, J.; BERRINGTON DE GONZALEZ, A.; APPLEBY, P.; PETO, J.; PLUMMER, M.; FRANCESCHI, S.; BERAL, V. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. **Lancet**, v.361, p.1159–67, 2003.

SMITH J.S.; BOSETTI C.; MUÑOZ N.; HERRERO, R.; BOSCH, F.X.; ELUF-NETO, J.; MEIJER, C.J.L.M.; VAN DEN BRULE, A.J.; FRANCESCHI, S.; PEELING, R.W.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. **Int J Cancer**, v.111, p.431–39, 2004.

SMITH, J.S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B.; KEYS, J.; FRANCESCHI, S.; WINER, R.; CLIFFORD, G.M. Human papillomaviruses type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **Int J Cancer**, v.121, p.621-632, 2007.

SMITH, B.C.; MCANDREW, T.; CHEN, Z.; HARARI, A.; BARRIS, D.M.; SHANKAR VISWANATHAN, S.; RODRIGUEZ, A.C.; CASTLE, P.; HERRERO, R.; SCHIFFMAN, M.; BURK, R.D. The Cervical Microbiome over 7 Years and a Comparison of Methodologies for Its Characterization. **PLoS ONE**, v.7, n.7, p.e40425. doi:10.1371/journal.pone.0040425, 2012.

SNIJDERS, P.J.F.; VAN DEN BRULE, A.J.F.; SCHRIJNEMAKERS, H.J.F.; SNOW, G.; MEIJER, C.J.L.M.; WALBOOMERS, J.M.M. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. **J. Gen. Virol.**, v.71, p.173–181, 1990.

SOBEL, J.D. Is there a prospective role for vaginal flora? **Current Infectious Disease Reports**, v.1, p.379-383, 1999.

SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v.369, n.9577, p.1961–71, 2007.

SOGIN M.L.; MORRISON H.G.; HUBER J.A.; MARK W.D.; HUSE S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proc Natl Acad Sci**, v.103, n.32, p.12115-12120, 2006.

SOOD, S. KAPIL, A. An update on *Trichomonas vaginalis*. **Indian J Sex Transm Dis.**, v.29, p.7-14, 2008.

SPEAR, G.T.; SIKAROODI, M; ZARIFARD, M.R.; LANDAY, A.L.; FRENCH, A.L.; PATRICK M. GILLEVET, P.M. Comparison of the Diversity of the Vaginal Microbiota in HIV-Infected and HIV-Uninfected Women with or without Bacterial Vaginosis. **J Infect Dis**, v.198, n.8, p.1131-40, 2008.

SRINIVASAN, S.; LIU, C.; MITCHELL, C.M.; FIEDLER, T.L.; THOMAS, K.K.; AGNEW, K.J.; MARRAZZO, J.M.; FREDRICKS, D.N. Temporal Variability of Human Vaginal Bacteria and Relationship with Bacterial Vaginosis. **PLoS ONE**, v.5, n.4, p.e10197, 2010.

STEVENS-SIMON, C.; JAMISON, J.; MCGREGOR, J.A.; DOUGLAS, J.M. Racial variation in vaginal pH among healthy sexually active adolescents. *Sex Transm Dis.* 1994; v.21, n.3, p.168–172, 1994.

THOMAS, T.D.; ELLWOOD, D.C.; MICHAEL, V.; LONGYEAR, C. Change from Homo- to Heterolactic Fermentation by *Streptococcus lactis* Resulting from Glucose Limitation in Anaerobic Chemostat Cultures. **Journal of Bacteriology**, v.138, n.1, p.109-117, 1979.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C.M.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. The human microbiome project. **Nature**, v.449, p.804-810, 2007.

VARUZZA, L. **Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração Versão 2.0.1.** 2013. Disponível em: <http://lvaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.0.1.pdf>. Acesso em: 19 mai 2016.

VERMITSKY, J.P.; SELF, M.J.; CHADWICK, S.G.; TRAMA, J.P.; ADELSON, M.E.; MORDECHAI, E.; GYGAX, S.E. Survey of vaginal-flora *Candida* species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection. **J Clin Microbiol**, v.46, n.4, p.1501–3, 2008.

VERSTRAELEN, H.; VERHELST, R.; CLAEYS, G.; TEMMERMAN, M.; VANEECHOUTTE, M. Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis. **Am J Obstet Gynecol** v.191, p. 1130–1132, 2004.

VERSTRAELEN, H.; VILCHEZ-VARGAS, R.; DESIMPEL, F.; JAUREGUI, R.; VANKEIRSBILCK, N.; WEYERS, S.; VERHELST, R.; DE SUTTER, P.; PIEPER, D.H.; VAN DE WIELE, T. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. **PeerJ**, v.4, p.e1602, 2016.

WARDLE, D.A. Stability of ecosystem properties in response to above-ground functional group richness and composition. **Oikos**, v.89, p.11–23, 2000.

WIESENFELD, H.C.; HILLIER, S.L.; KROHN, M.A.; LANDERS, D.V.; SWEET, R.L. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. **Clin Infect Dis**, v.36, p.663-668, 2003.

WHILEY, D.M.; BUDA, P.J.; BAYLISS, J.; COVER, L.; BATES, J.; SLOOTS, T.P. **A new confirmatory *Neisseria gonorrhoeae* real-time PCR assay targeting the porA pseudo-gene.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.23, p. 705-710, 2004.

WHILEY, D.M.; TAPSALL, J.W.; SLOOTS, T.P. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*. An ongoing challenge. **J Mol Diagn**, v.8, p.3-15, 2006.

WHITE, A.E.; LIVANOS, E.M.; TLSTY, T.D. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev*, n.8, p.666-677, 1994.

WHO. World Health Organization. **Sexually Transmitted Infections (STIs)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>>. Acesso em: 20 jun 2016.

WOLSCHICK, N.M.; CONSOLARO, M.E.L.; SUZUKI, L.E.; BOER, C.G. Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. **RBAC**, v.39, n.2, p.123-129, 2007.

ZIARRUSTA, G.B. Vulvovaginitis candidiásica. **Ver Iberoam Micol**, v.19, p.22-4, 2002.

ZHOU, X.; BENT, S.J.; SCHNEIDER, M.G.; DAVIS, C.C.; ISLAM, M.R.; FORNEY, L.J. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. **Microbiology**, v.150, n. Pt8, p.2565-2573, 2004.

ZHOU, X.; WESTMAN, R.; HICKEY, R.; HANSMANN, M.A.; KENNEDY, C.; OSBORN, T.W.; FORNEY, L.J. Vaginal microbiota of women with frequent vulvovaginal candidiasis. **Infect Immun.**, v.77, n.9, p.4130-5, 2009.

ZHOU, X.; BROTMAN, R.M.; GAJER, P.; ABDO, Z.; SCHÜETTE, U.; MA, S.; RAVEL, J.; FORNEY, L.J. Recent advances in understanding the microbiology of the female reproductive tract and the causes of premature birth. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, n. 737425, p.1-10, 2010.

ANEXOS

Protocolo de Extração de DNA QIAGEN com modificações

1. O microtubo contendo a amostra foi homogeneizado em vórtex durante 40 segundos, após descongelamento à temperatura ambiente;
 2. Centrifugou-se o microtubo durante 5 min a 8.000 rpm, com a escovinha dentro. Em seguida, a escovinha foi retirada do microtubo, sendo espremida em papel de selo estéril.
 3. Adicionou-se 20 µL de Proteinase K (kit) ao microtubo, homogeneizando-se em vórtex;
 4. Foram adicionados ainda 200 µL de Tampão AL (kit) e 200 µL de TPK (900 µL de TE; 100 µL de Tween 20 a 20% e 20 µL de proteinase K 10 mg/mL), homogeneizando-se essa mistura durante 30 seg. por pulso-vórtex ou até que a solução ficasse homogênea;
 5. A mistura foi incubada a 56°C durante 1 hora;
 6. Após a incubação, foi dado um spin para a remoção de gotículas de amostras da tampa. Foram reservados 400 µL dessa mistura para armazenamento a -20°C. Ao restante da mistura, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se durante 30 seg por pulso-vórtex. Em seguida, foi dado um spin para a remoção de gotículas de amostra da tampa;
 7. Cuidadosamente, para que as bordas não fossem molhadas, a mistura foi transferida para um novo microtubo de 2 mL (kit) contendo o Spin Column (kit). O microtubo foi centrifugado durante 1 min a 8.000 rpm e, em seguida, o Spin Column foi transferido para um novo microtubo de 2 mL (kit), descartando-se o microtubo contendo o filtrado;
 8. Cuidadosamente, para que as bordas não fossem molhadas, foram adicionados 500 µL do Tampão AW1 (kit) ao microtubo contendo o Spin Column. O microtubo foi centrifugado durante 1 min a 8.000 rpm e, em seguida, o Spin Column foi transferido para um novo microtubo de 2 mL, descartando-se o microtubo contendo o filtrado;
 9. Cuidadosamente, para que as bordas não fossem molhadas, foram adicionados 500 µL do Tampão AW2 (kit) ao microtubo contendo o Spin Column. O microtubo foi centrifugado durante 3 min a 8.000 rpm e, em seguida, o Spin Column foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL (kit), descartando-se o microtubo contendo o filtrado;
 10. Foram adicionados 50 µL de Tampão AE (kit) ao Spin Column e esse microtubo foi incubado à temperatura ambiente overnight;
 11. O microtubo foi centrifugado durante 1 min a 8.000 rpm e o Spin Column foi descartado. As amostras foram mantidas a -20°C até a sua utilização.
-

Protocolo para Precipitação de DNA com Isopropanol/Etanol (*Applied Biosystems*)

1. Foram adicionados 80 μ L de Isopropanol 75% em cada poço de uma placa contendo 96 poços (com reação de seqüenciamento de 20 μ L);
2. A placa foi selada e deixada em temperatura ambiente durante 15 min.;
3. Em seguida, a placa foi centrifugada durante 30 min. a 4000 rpm em centrífuga refrigerada;
4. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente;
5. Foi aplicado um pulso na centrífuga com a placa invertida em papel absorvente;
6. Foram adicionados 200 μ L de Etanol 70% em cada amostra e a placa foi selada, novamente;
7. Centrifugou-se durante 10 min. a 4000 rpm, em centrífuga refrigerada;
8. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente;
9. Os passos de 6 a 8 foram repetidos;
10. A placa foi acondicionada em termociclador a 60°C durante 5 a 8 min. para que o “*pellet*” secasse;

Em seguida, as amostras foram preparadas para o sequenciador

Protocolo para Preparo de Amostras para o ABI 3500

1. Foram adicionados 10 μ L de Formamida Hi-Di em cada amostra;
 2. A placa foi selada e vortexada, em seguida, aplicou-se um pulso na centrífuga;
 3. As amostras foram desnaturadas em termociclador durante 2 min. a 95°C;
 4. Em seguida, a placa foi imediatamente colocada no gelo durante 2 min.;
 5. Foi aplicado um pulso na centrífuga para remoção de bolhas de ar;
 6. O adesivo foi removido e a septa foi colocada na placa;
 7. Em seguida, a placa com a bandeja e tampa adaptadora foram colocadas no “autosampler”.
 8. As amostras com formamida foram corridas antes de completar 48 h para prevenir a degradação da fluorescência e da própria formamida.
-

Perfis eletroforéticos referentes às ampliações para o Diagnóstico Molecular de patógenos

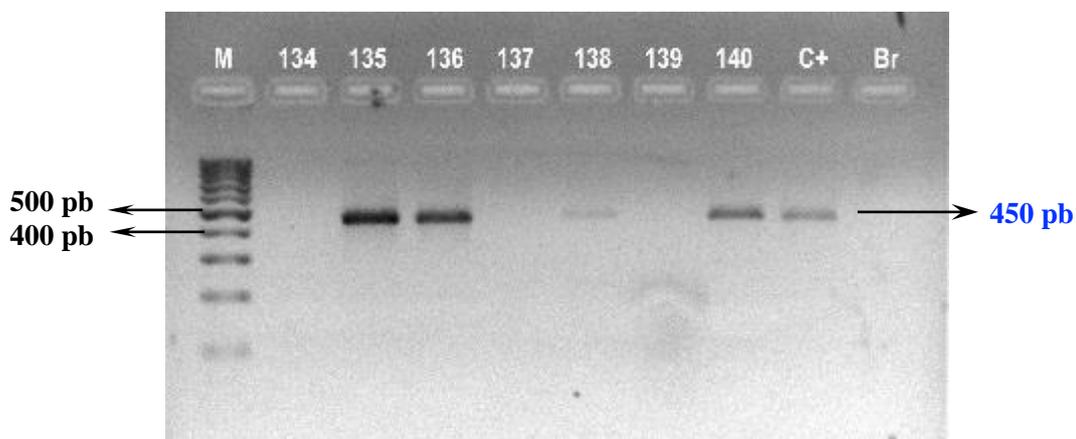


Figura 5: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 450 pb, utilizando-se os *primers* MY09/MY11 (MANOS et al., 1989). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Amostras 134-140; C+: Controle positivo; Br: Branco.

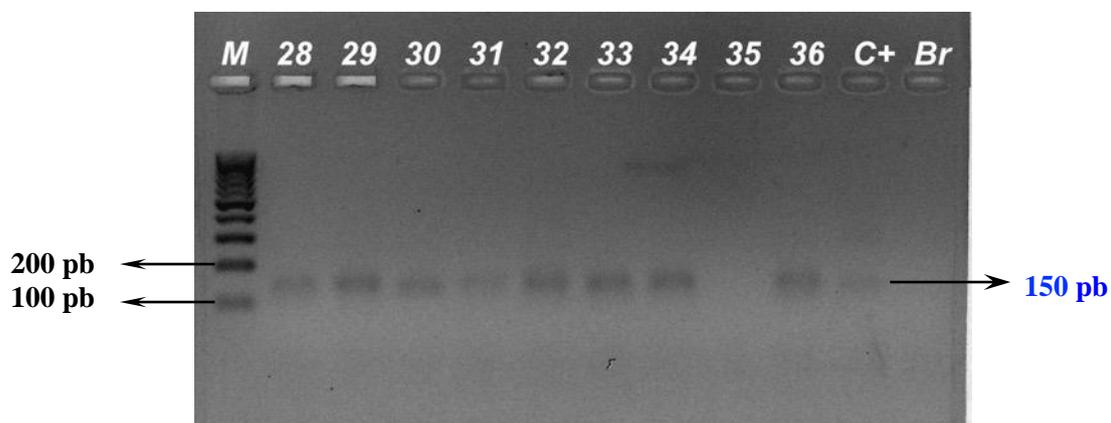


Figura 6: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 150 pb, utilizando-se os *primers* GP5/GP6 (EVANDER et al., 1992). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Amostras 28-36; C+: Controle positivo; Br: Branco.

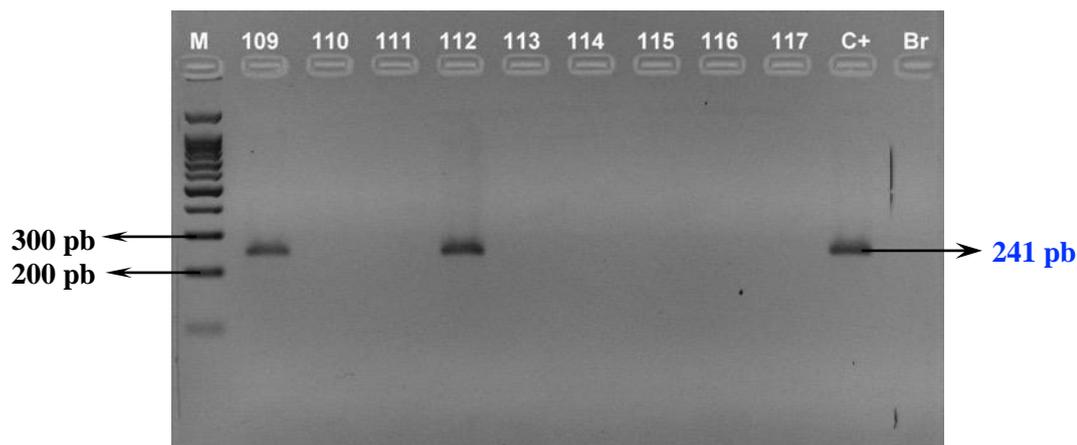


Figura 7: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 241 pb, utilizando-se dos *primers* KL1/KL2 (MAHONY et al., 1993). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Amostras 109-117; C+: Controle positivo; Br: Branco.

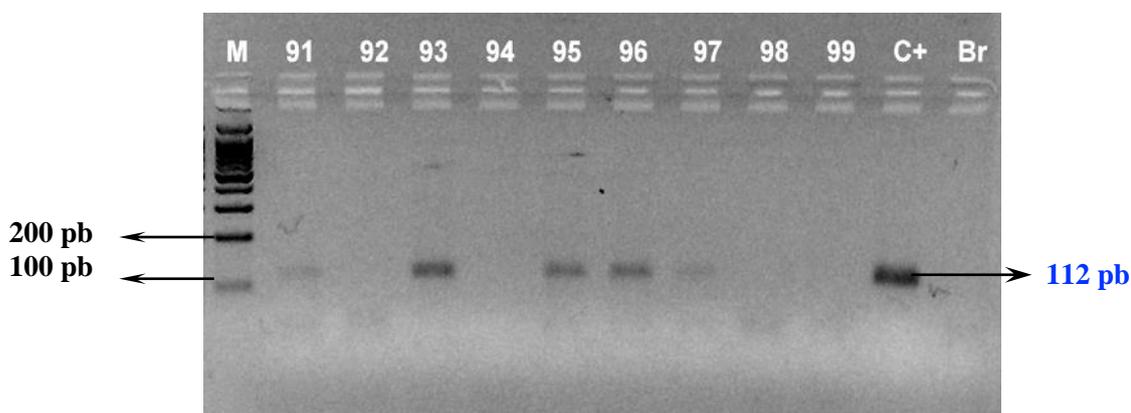


Figura 8: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 112 pb, utilizando-se dos *primers* BTUB9/BTUB2 (MADICO et al., 1998). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Amostras 91-99; C+: Controle positivo; Br: Branco.

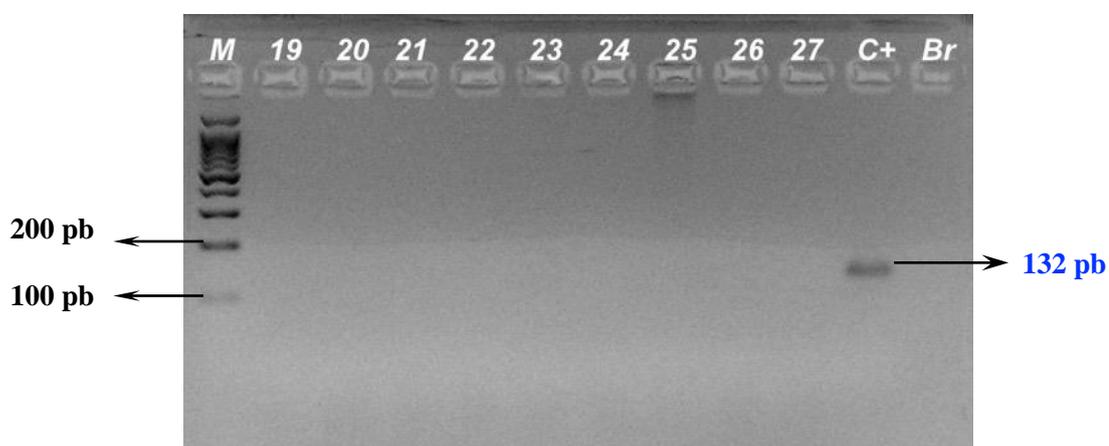


Figura 9: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 132 pb, utilizando-se dos *primers* PapF/PapR (WHILEY et al., 2004). M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Amostras 19-27; C+: Controle positivo; Br: Branco.

Perfis eletroforéticos referentes às ampliações para da montagem de bibliotecas das regiões V1-V2 do gene 16S rRNA

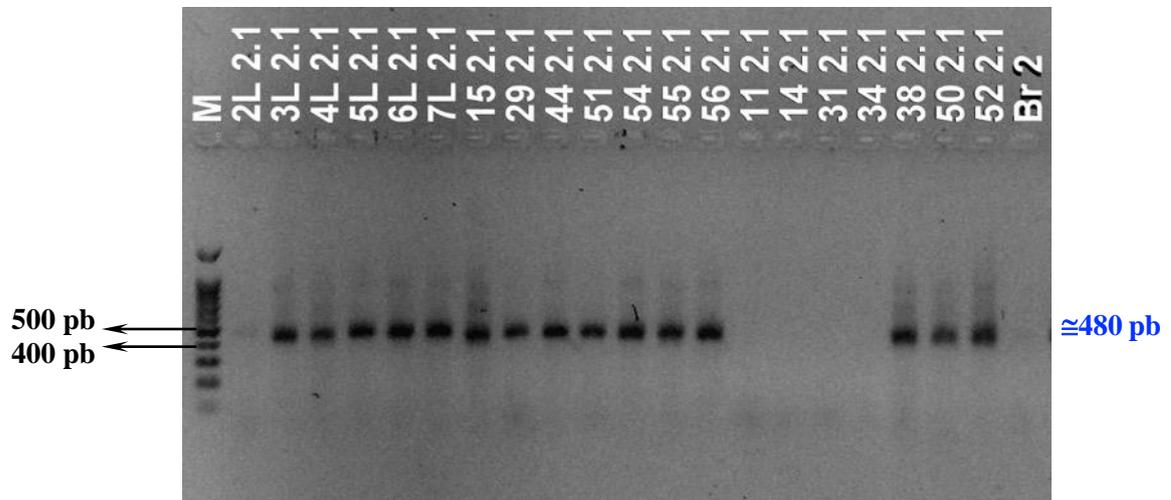


Figura 10: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento $\cong 480$ pb, utilizando-se os *primers* A1MF-A10MF/P11MR e P12MR, antes da padronização da PCR. M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Br: Branco.

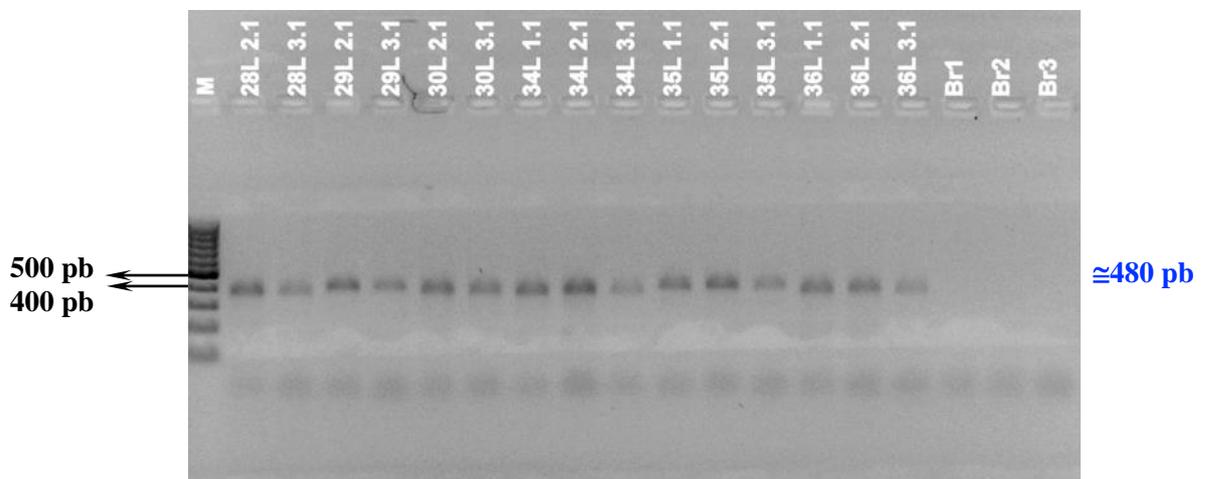


Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento $\cong 480$ pb, utilizando-se os *primers* A1MF-A10MF/P11MR e P12MR, após padronização de PCR. M: Marcador de peso molecular 100 pb *Invitrogen Life Technologies*; Br: Branco.

APÊNDICES





**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Sra. está sendo convidada a participar da Pesquisa intitulada: “Diversidade Microbiana do Trato Genital Feminino”, que tem por objetivo investigar a diversidade microbiana em amostras cervicais de mulheres em quatro tipos de situações distintas para obter o possível entendimento entre a microbiota vaginal e o estado de saúde do trato genital feminino e alternativas para o desenvolvimento de novas terapias ou diagnósticos de algumas das principais patologias do trato genital feminino. As situações são estas: 1. microbiota vaginal normal; 2. vaginose bacteriana; 3. *Candida sp* e 4. lesões pré-malignas e malignas do colo do útero.

Sua participação nesta pesquisa consistirá na autorização para a coleta de uma parte do material cervical durante a realização do preventivo e em responder às perguntas do roteiro de entrevistas.

A coleta do material cervical será realizada por uma pessoa especializada com material descartável e novo. O máximo que pode ocorrer é certo desconforto com a informação sobre uma possível infecção naquele momento. Este desconforto é em seu benefício e da população feminina, mas não há risco algum relacionado. O material que não for utilizado será guardado e poderá ser usado em pesquisas futuras relacionadas a esta não ultrapassando o tempo máximo de 5 anos.

Sua participação é voluntária e, durante o período da pesquisa, você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento relacionado à pesquisa e a liberdade para desistir de participar ou retirar seu consentimento independente do motivo. Sua recusa não trará prejuízo algum ao atendimento que estará recebendo. Para isso, disponibilizamos o telefone (92) 3305-4230 e e-mail: evelyn_lira@ufam.edu.br.

A Sra. não terá nenhuma despesa ou quaisquer compensações financeiras. A sua participação é importante para o desenvolvimento das pesquisas relacionadas às patologias do trato genital feminino, ao diagnóstico e ao tratamento destas patologias, pouco conhecidas.

Os dados e materiais coletados serão confidenciais e em nenhum momento será divulgado o seu nome em qualquer fase do estudo. Os resultados desta pesquisa serão divulgados apenas em eventos ou publicações a nível científico, não havendo identificação dos voluntários.

AUTORIZAÇÃO

Declaro estar ciente do teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO bem como dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetida, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Declaro ainda estar recebendo uma cópia deste documento onde consta telefone e e-mail para esclarecimentos sempre que desejar e que este está assinado. Sendo assim, concordo de espontânea vontade em participar deste estudo sabendo que dele poderei desistir a qualquer momento sem sofrer qualquer punição ou constrangimento.

Assinatura da Participante

/ /
Data

ou



Impressão do Polegar caso não saiba assinar

Pesquisadora Responsável

/ /
Data

ROTEIRO DE ENTREVISTA

ID: _____

I. TRIAGEM

1. Informações sobre o estudo e confiabilidade do estudo
2. Data de nascimento ____/____/____ Idade:_____
3. Data da última menstruação ____/____/____
4. Mora a quanto tempo em Manaus?
 - 4.1 () 2 anos ou mais
 - 4.2 () mais de 5 anos
5. Onde nasceu?
 - 5.1 () Manaus
 - 5.2 () Interior do estado do Amazonas Qual? _____
 - 5.3 () Outro estado da região norte Qual? _____
 - 5.4 () Outro estado da federação Qual? _____
6. Onde reside? _____
7. Nome: _____
8. Apresenta corrimento? () SIM* () NÃO
 - *8.1 Qual a cor? _____
 - *8.2 Possui mau cheiro? _____
 - *8.3 Acompanha coceira? _____
9. Sente dor abdominal? () SIM () NÃO

II. QUESTIONÁRIO

10. Nível de Escolaridade:
 - 11.1 () 1º Grau
 - 11.2 () 2º Grau
 - 11.3 () Profissionalizante
 - 11.4 () Ensino Superior
11. Estado Civil:
 - 12.1 () Solteira
 - 12.2 () União Estável
 - 12.3 () Casada
 - 12.4 () Divorciada
 - 12.5 () Viúva
12. Renda Familiar (Salário Base: R\$622,00):
 - 13.1 () 1 salário mínimo
 - 13.2 () 2-4 salários mínimos
 - 13.3 () 5-6 salários mínimos
 - 13.4 () acima de 6 salários mínimos
13. Idade da 1ª relação sexual: _____
14. Utiliza algum método para evitar filhos?
 - 14.1 () Sim Qual? _____
 - 14.2 () Não

24. Resultado de biópsia/exame histopatológico:

24.1 () NIC I

24.2 () NIC II

24.3 () NIC III/Ca “in situ”

24.4 () Carcinoma microinvasor

24.5 () Carcinoma escamoso invasor

24.6 () Adenocarcinoma

24.7 () Normal

OBSERVAÇÕES
