

Estudo da microbiota do colo uterino por Gram em pacientes com infecção por HPV e Lesões Intraepiteliais Escamosas

Rafael Pereira de Vasconcelos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor José Eleutério Júnior
Co-Orientador: Professor Doutor José Eduardo Brites Cavaco

Junho de 2020

Dedicatória

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e sua dedicação foram o que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir.

A minha namorada Camilla por todo cuidado e compreensão neste caminho tão delicado. A família Bandini por orientar-me em momentos tão delicados, e também por motivar-me em momentos em que a dificuldade chegava.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer de maneira especial o Prof. Dr. Eleutério por toda sua orientação e cuidado.

Dra. Renata Eleutério por todo auxílio e empenho nesta caminhada.

Dra. Natalice por toda sua atenção, orientação e cuidado em todos os passos do longo processo.

Resumo

A microbiota vaginal é alvo de diversos estudos devido a sua diversidade de microrganismos. Um dos microrganismos que se podem estabelecer na microbiota vaginal é o vírus do papiloma humano (HPV – Human Papillomavirus) que se estabelece nas células imaturas do trato genital feminino. Após a infecção pelo HPV e subsequente evasão do sistema imune, o vírus entra na sua fase de disseminação celular e pode persistir por meses ou até mesmo por anos podendo ocasionar lesões intraepiteliais de baixo ou alto grau.

Com este estudo, pretendem-se avaliar os diferentes tipos de microbiota cervical e identificar as suas características no esfregaço de material residual de citologia em meio líquido, associando com o HPV e com *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*.

Para a realização dos ensaios, utilizou-se *Xpert HPV* que utiliza PCR em tempo real (RT-PCR) de segunda geração para deteção de infecção por HPV de alto risco de células escamosas. Para a identificação dos agentes do painel de IST (Infecção Sexualmente Transmissível), realizou-se o ensaio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real utilizando-se o *multiplex Allplex™ STI Essentials Assay*. Para a confecção das lâminas, realizou-se a técnica de Gram.

Os resultados mostram que a heterogeneidade da microbiota, a quantidade e a capacidade de formação de biofilmes são significativamente maiores em quadros de vaginose bacteriana. Verificou-se que a *Candida sp* só foi evidenciada na vaginose bacteriana do tipo 1, sem a presença de bacilos curvos, sugestivo de *Mobiluncus sp*. Verificou-se que o agente *Mycoplasma hominis* e o HPV de alto risco possuem a maior percentagem quando sobreposto a presença de biofilme. O agente *Mycoplasma hominis* obteve resultado de 50% quando sobreposto aos parâmetros de vaginose bacteriana do tipo 2.

Esses resultados mostram que o HPV de alto risco pode interferir na formação da microbiota vaginal assim a vaginose bacteriana possui relação com os agentes do painel de IST em especial o *Mycoplasma hominis* que representou 65% dos resultados.

Palavras-chave

Microbiota; biofilme; papilomavírus humano

Abstract

The vaginal microbiota has been widely studied due to its microorganism's diversity. One of the microorganisms that can settle the vaginal microbiota is the Human Papilloma Virus (HPV) infecting immature cells of the female genital tract. After HPV infection and subsequent evasion of the immune system, the virus can disseminate through the cells, persisting for months or even years, leading to low or high grade intraepithelial lesions.

This research aims to evaluate different microorganisms on cervical microbiota and identify its characteristics in the smear of liquid cytology residual material, associating with HPV and *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*.

For this purpose, the second generation of real time PCR was assessed through the Xpert HPV to detect high-risk HPV infection in squamous cells. Also, the real time PCR was performed by multiplex Allplex™ STI Essentials Assay aiming to identify the agents of the STI (Sexually Transmitted Infection) panel. The Gram technique was performed to prepare the slides.

The results showed that the heterogeneity of the microbiota, the amount and capacity of biofilm formation are significantly greater in bacterial vaginosis. It was identified that *Candida sp* was only evidenced in type 1 bacterial vaginosis without the presence of curved bacilli, suggestive of *Mobiluncus sp*. The *Mycoplasma hominis* and high-risk HPV had the highest percentage report in the presence of biofilm. And the *Mycoplasma hominis* reported 50% of findings when overlapping reports of type 2 bacterial vaginosis.

Based on our results, the present study showed that high-risk HPV can interfere with the vaginal microbiota formation and that bacterial vaginosis has a relationship with the agents of the STI panel especially *Mycoplasma hominis* which representing 65% of the findings.

Keywords

Microbiota; biofilm; human papilloma virus

Índice

Capítulo 1: Introdução	25
1.1 Microbiota Vaginal	25
1.1.1 Homeostase da Microbiota Vaginal	26
1.1.2 Situações de Descontrole da Microbiota	27
1.2 Papilomavírus Humano - HPV	28
1.2.1 Persistência da Infecção pelo HPV	31
1.2.2 Ciclo do Papilomavírus Humano - HPV	32
1.3 Lesões de baixo e alto grau	35
1.3.1 Epitélio Escamoso do Colo Uterino	35
1.3.2 Lesão Intraepitelial Escamosa	36
1.3.3 Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL)	37
1.3.4 lesões Intraepiteliais Escamosas de Alto Grau (HSIL)	37
1.4 Biofilme	38
1.5 Relação do Papilomavírus Humano com a microbiota local e seus efeitos	41
Capítulo 2: Objetivos	43
2.1 Objetivos Gerais	43
2.2 Objetivos Específicos	43
Capítulo 3: Materiais e Metodologia	45
3.1 Materiais	45
3.1.1 Equipamentos	45
3.1.2 Materiais	45
3.1.3 Reagentes	
3.2 Metodologia	45
3.2.1 Localização do Estudo	46
3.2.2 Critérios para Seleção de Pacientes	46
3.2.3 Critérios de Inclusão de pacientes	46
3.2.4 Critério de Exclusão de Pacientes	46
3.3 Métodos de Análise do Material	46
3.3.1 Detecção do Papilomavírus Humano - HPV	46
3.3.2 PCR em Tempo Real para o Painel de Infecções Sexualmente Transmissíveis	47
3.3.3 Técnica de Gram	48

Capítulo 4: Resultados	49
Capítulo 5: Discussão	58
Capítulo 6: Conclusões	65
Referências Bibliográficas	67

Lista de Figuras

Capítulo 1: Introdução

- Figura 1.1 – Agentes do controlo da microbiota vaginal (Adaptado de Zhou, Way, and Chen 2018). 27
- Figura 1.2 – Organização do genoma do HPV e funções das principais proteínas virais (Adaptado de Ferreira *et al.* 2020). 29
- Figura 1.3 – Progressão e persistência da infeção por HPV. CIN, neoplasia intraepitelial central (*central intraepithelial neoplasia*); LSIL, lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (*low-grade squamous intraepithelial lesions*); HSIL, lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (*high-grade squamous intraepithelial lesions*) (Adaptado de Shanmugasundaram and You 2017). 30
- Figura 1.4 – Ciclo viral (Adaptado de Bordignon *et al.* 2017). 33
- Figura 1.5 – Progressão citologia e molecular do HPV (Adaptado de Ferreira *et al.* 2020). 33
- Figura 1.6 – Cascata intracelular das proteínas E6 e E7 do HPV (Adaptado de Litwin *et al.* 2017). 35
- Figura 1.7 – Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (Pires 2009). 37
- Figura 1.8 – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (Adaptado de Cibas and Al 2009). 38
- Figura 1.9 – Diagrama ilustrativo das etapas de formação de um biofilme (Adaptado de Rickard *et al.* 2003). 39
- Figura 1.10 – Representação esquemática do teste de macrodiluição em tubo, após a inoculação e incubação (Adaptado de Murray and Baron 2003). 40
- Figura 1.11 – Métodos de defesa utilizado pelas bactérias contra os fármacos (Adaptado de Peterson and Kaur 2018). 40

Capítulo 3: Materiais e Metodologia

- Figura 3.1 – Máquina GeneXpert utilizada para deteção do HPV (Adaptado de Cepheid 2020). 47
- Figura 3.2 – Exemplificação de resultados obtidos do painel de IST (Adaptado de Seegene Brazil 2019). 47
- Figura 3.3 – Exemplificação do software utilizado para a obtenção dos resultados da pesquisa do painel de IST (Adaptado de Seegene Brazil 2019). 48

Capítulo 4: Resultados

Figura 4.1 – A) Exemplo de escore de Nugent 0 a 3 (normal) (Gram 1000x); B) Exemplo de escore de Nugent 4 a 6 (intermediária) (Gram 1000x); C) Exemplo de escore de Nugent 7 a 10 (vaginose bacteriana). Neste caso tipo 1 (Gram 1000x); D) Exemplo de vaginose bacteriana (escore de Nugent 7 a 10) tipo 2, onde se observam os bacilos curvos Gram negativos (Gram 1000x).	51
Figura 4.2 – Identificação de morfotipo de <i>Candida sp</i> em caso de microbiota considerada normal pelo escore de Nugent (0 a 3) (Gram 1000x).	53
Figura 4.3 – Identificação de morfotipo de <i>Candida sp</i> em caso de microbiota considerada intermediária pelo escore de Nugent (4 a 6) (Gram 1000x).	53
Figura 4.4 – Identificação de morfotipo de <i>Candida sp</i> em caso de microbiota considerada vaginose bacteriana pelo escore de Nugent (7 a 10) (Gram 1000x).	53

Lista de Tabelas

Capítulo 1: Introdução

Tabela 1.1 – Grupos de baixo e de alto risco do HPV (Adaptado de Ferreira *et al.* 2020). 30

Tabela 1.2 – Classificação dos diferentes sistemas de classificação de anormalidades escamosas da citologia cervical (Adaptado de Vooijs, Bulten, and Erp 2008). 36

Capítulo 4: Resultados

Tabela 4.1 – Estudo das características dos esfregaços corados por Gram, como presença de células imaturas, de células inflamatórias, de citólise, de heterogeneidade e quantidade de morfotipos bacterianos e capacidade de formar biofilme, em casos categorizados pelo escore de Nugent como de normalidade (0 a 3), microbiota intermediária (4 a 6) e vaginose bacteriana (VB) (7 a 10). 50

Tabela 4.2 – Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano (com genotipagem) por reação em cadeia de polimerase em tempo real em casos de normalidade, microbiota intermediária e vaginose bacteriana (VB). 52

Tabela 4.3 – Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a heterogeneidade dos morfotipos bacterianos estudados em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram. 54

Tabela 4.4 – Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a quantidade dos morfotipos bacterianos estudados em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram. 55

Tabela 4.5 – Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a identificação de morfotipos formando biofilmes em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram. 56

Tabela 4.6 – Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a o tipo de vaginose bacteriana (VB). VB1 sem bacilos curvos, VB2 com bacilos curvos.

57

Lista de Acrónimos

AR	Alto risco
CIM	Concentração inibitória mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EPS	Matriz de exopolissacarídeos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Viruses</i>)
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HPV	Papilomavírus Humano (<i>Human Papillomavirus</i>)
HR-HPV	HPV de alto risco (<i>High-risk HPV</i>)
HSIL	Lesões Intraepiteliais Escamosas de Alto Grau (<i>high-grade squamous intraepithelial lesions</i>)
IST	Infeção Sexualmente Transmissível
LSIL	Lesões Intraepiteliais Escamosas de Baixo Grau (<i>low-grade squamous intraepithelial lesions</i>)
mRNA	RNA mensageiro
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
P16INK4A	Inibidor da cinase dependente de ciclina
Pap	Exame de Papanicolau
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
Rb	Proteína do Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
UFC	Unidade formadora de colônia (<i>colony forming unit</i>)
URR	Região Regulatória
VB	Vaginose bacteriana
VB1	Vaginose bacteriana tipo 1 (sem bacilos curtos)
VB2	Vaginose bacteriana tipo 2 (com bacilos curtos)

Capítulo 1

Introdução

Diversos microrganismos habitam o corpo humano e unem-se para colonizar microambiente como o gastrointestinal, trato respiratório, vaginal entre outros (Dethlefsen, McFall-Ngai, and Relman 2007).

O termo microbiota foi primeiramente sugerido por Joshua Lederberg como “a comunidade ecológica de microrganismos comensais e patogénicos que literalmente compartilham o espaço do nosso corpo” (Lederberg and McCray 2001).

A microbiota humana é compreendida por microrganismos que incluem bactérias, fungos, vírus e protozoários, desempenha funções essenciais que definem condições fisiológicas, imunológicas e nutricionais, as quais contribuem para a homeostasia do hospedeiro podendo existir variações interindividuais de acordo com o sexo, a idade, a dieta, os fatores ambientais como o pH, a humidade, a temperatura, a disponibilidade de nutrientes e estados patogénicos (Eloe-Fadrosch and Rasko 2013).

Desta forma, o papel da microbiota nos processos de saúde e da doença tem recebido maior atenção devido à possibilidade de quantificação e de tipagem desses microrganismos, bem como do conhecimento da 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 (Hess *et al.* 2011).

1.1 Microbiota Vaginal

Datado da década de 1890, Albert Döderlein foi o primeiro cientista a descobrir a importância das bactérias produtoras de ácido láctico na vagina (Mendling 2016; S. Thomas 1928). Em estudos posteriores, Stanley Thomas cunhou o termo *Lactobacillus acidophilus*. Em 1980, Lauer, Helming e Kandler foram capazes de distinguir várias espécies de *Lactobacillus* anteriormente denominadas *L. acidophilus* por hibridação (Mendling 2016).

No início do século passado, foram feitas as primeiras tentativas de classificar a microbiota vaginal. Manu af Heurlin caracterizou a microbiota vaginal de crianças, de

mulheres grávidas e não gestantes e de mulheres em idade avançada e tentou estabelecer graus de saúde. Robert Schröder foi o primeiro a definir três tipos de microbiota vaginal bacteriologicamente diferentes denominados “Reinheitsgrade” (graus de pureza). Otto Jirovec distinguiu entre seis tipos de microbiota vaginal: normal, anormal, anormal com muitos leucócitos, gonorreia, tricomoníase, candidose (Jirovec, Peter, and Malek 1948; Schröder 1921).

Em 1955, Herman Gardner e Charles Dukes descreveram o *Haemophilus vaginalis*, mais tarde renomeado como *Gardnerella vaginalis* como o principal causador da vaginose bacteriana (VB), o distúrbio mais comum da microbiota vaginal (Gardner and Dukes 1955; Greenwood and Pickett 1980).

No final do século passado, a definição até então válida de vaginose bacteriana foi descrita como "uma substituição de *Lactobacillus* por grupos característicos de bactérias acompanhadas por propriedades alteradas do fluido vaginal". Com o advento das tecnologias moleculares e genéticas, foi necessário reconsiderar a visão e a definição de microbiota vaginal normal. Novas bactérias foram descobertas e os conceitos de biofilme bacteriano e de microbiota vaginal foram introduzidos (Hovelius and Mårdh 1984).

A cavidade vaginal serve como um compartimento rico em nutrientes que apresenta uma microbiota diversa e dinâmica que consistem em uma variedade de bactérias que mudam constantemente ao longo dos diferentes estágios da vida da mulher (Farage and Maibach 2006).

1.1.1 Homeostase da Microbiota Vaginal

Para preservar contra infecções urogenitais e disbiose, existem mecanismos de proteção que garantem o saudável funcionamento da comunidade microbiana vaginal. Como dito anteriormente, os *Lactobacillus* são os agentes majoritários na microbiota da maioria das mulheres com microbiota vaginal saudável (Ma, Forney, and Ravel 2012; Ravel *et al.* 2011).

A regulação do pH vaginal humano é única quando comparada a outros mamíferos não humanos. A microbiota vaginal humana é composta por aproximadamente 70% de espécies de *Lactobacillus*, enquanto outros mamíferos têm menos de 1%. Devido a essas características, o pH da vagina humana é muito mais ácido (3,8 - 4,5) quando comparado aos mamíferos não humanos (5,4-7,8) (Yildirim *et al.* 2014).

Por outro lado, a ausência de *Lactobacillus* vaginais, entre mulheres no menacme, tem sido associada a várias doenças. Em estudos clínicos anteriores, amostras vaginais coletadas de mulheres com e sem várias condições de doença urogenital foram cultivadas

usando métodos microbiológicos padrão para isolar *Lactobacillus* e foram comparadas quanto a características como a presença ou a ausência de *Lactobacillus sp.*, especialmente *Lactobacillus* produtores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Verificou-se que mulheres com falta de *Lactobacillus* vaginais por cultura vaginal, particularmente aquelas com amostras vaginais com quantidades relativas reduzidas ou ausência total de *Lactobacillus* produtores de H_2O_2 , corriam um risco aumentado para uma variedade de condições de doenças urogenitais, incluindo vaginose bacteriana, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV – *Human Immunodeficiency Viruses*) e *Neisseria gonorrhoeae*, assim como colonização vaginal por *Escherichia coli*, a causa mais comum de infecção do trato urinário em mulheres (Martin *et al.* 1999; van De Wijgert *et al.* 2000; Zheng, Alcorn, and Cohen 1994).

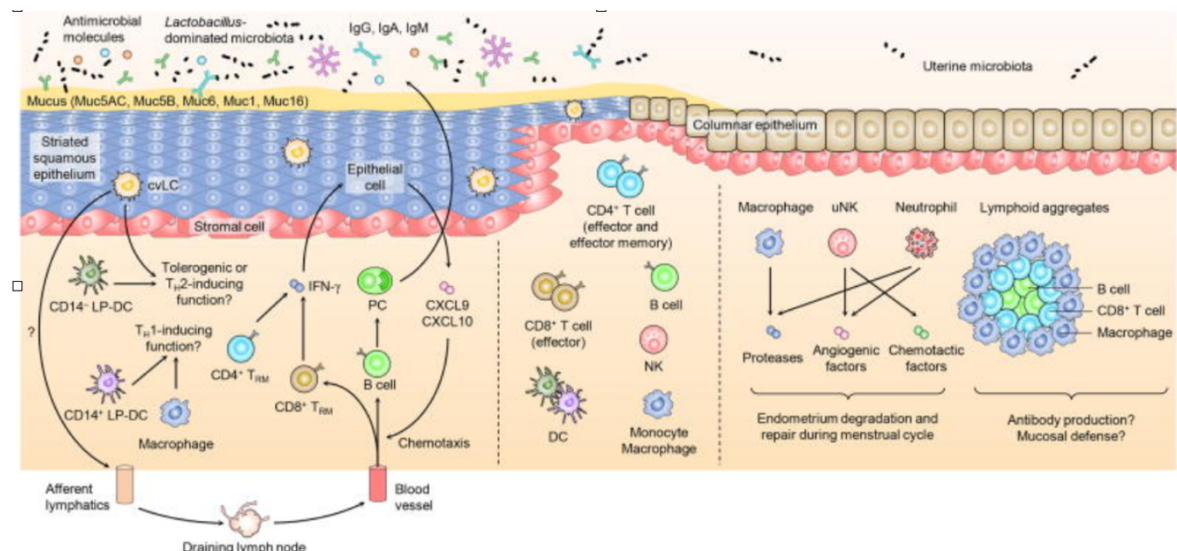


Figura 1.1 – Agentes do controle da microbiota vaginal (Adaptado de Zhou, Way, and Chen 2018).

Os mecanismos propostos pelos quais os *Lactobacillus* podem impedir a colonização vaginal por uropatógenos incluem a exclusão competitiva destes pela adesão das espécies de *Lactobacillus* às células uroepiteliais, a redução do pH vaginal pela produção de ácido lático, a produção de bacteriocinas, surfactantes e outros produtos antimicrobianos, e, finalmente, a produção de H_2O_2 , conforme Figura 1.1 (Boris and Barbés 2000; Osset *et al.* 2001).

1.1.2 Situações de Descontrole da Microbiota

Diversas espécies ocupam locais no corpo humano que podem ser afetados pelo estado físico do hospedeiro, fatores intrínsecos, estágio do ciclo de vida, níveis hormonais, respostas imunes, estado nutricional e estado da doença. A microbiota vaginal assim

como outras microbiotas pode ser alterada por fatores externos. No caso da microbiota vaginal esses fatores são especialmente exposições ambientais, competições interespecies microbianas e hábitos de higiene (Bolton, van der Straten, and Cohen 2008).

Os *Lactobacillus* são os mais prevalentes e frequentemente numerosos microrganismos predominantemente dominantes, de 10 a 100 UFC/g de fluido vaginal em mulheres saudáveis na pré-menopausa. A lista dos lactobacilos mais encontrados na microbiota vaginal saudável é formada por *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, seguidas por *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus* (Farage, Miller, and Sobel 2010).

Quando os níveis de estrogênio caem, o conteúdo de glicogênio no epitélio vaginal também cai, levando à depleção de *Lactobacillus*. Um número decrescente de *Lactobacillus* resulta num aumento subsequente do pH vaginal, uma vez que a glicose não é convertida em ácido láctico. Valores altos de pH estão associados ao crescimento de bactérias patogênicas, particularmente a colonização por bactérias entéricas (Cribby, Taylor, and Reid 2008).

A interação entre os integrantes da microbiota vaginal não é muito bem descrita pela literatura. No entanto, é reconhecido que a composição da microbiota vaginal é variável até mesmo de dia para dia, isso em mulheres sem qualquer indicação de infecção. Estudos prévios que utilizaram culturas vaginais ou esfregaços vaginais mostraram que existe mudança significativa da microbiota vaginal de forma transitória. A fase mais rotineira para ocorrer essas alterações são a fase do ciclo menstrual da descamação (menstruação) (Cribby, Taylor, and Reid 2008).

Os microrganismos que colonizam o ambiente vaginal têm um importante papel na prevenção de doenças do hospedeiro, incluindo vaginose bacteriana, infecção do trato urinário, vaginite por leveduras e doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o HIV e o papilomavírus humano (HPV – *Human Papillomavirus*) (Reid and Bocking 2003).

1.2 Papilomavírus Humano - HPV

O Papilomavírus Humano (HPV), um membro da família *Papillomaviridae*, é um pequeno vírus de DNA (8kb), não envolto e de fita dupla como pode ser evidenciado pela Figura 1.2. A infecção pelo HPV está associada a uma ampla gama de patologias. O HPV é o fator etiológico das verrugas cutâneas benignas e da papilomatose respiratória juvenil, além de lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL - *low-grade squamous intraepithelial lesions*), lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL -

high-grade squamous intraepithelial lesions), precursor do cancro e carcinoma invasivo (Doorbar *et al.* 2012; Groves and Coleman 2015).

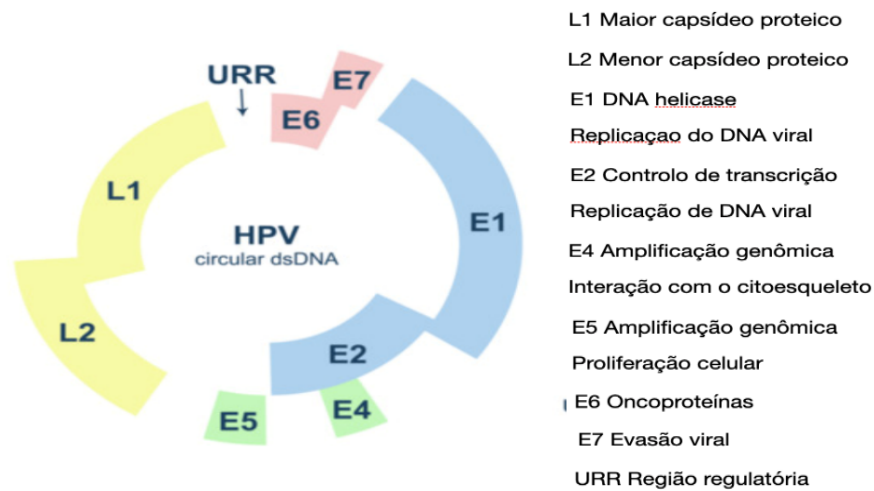


Figura 1.2 - Organização do genoma do HPV e funções das principais proteínas virais (Adaptado de Ferreira *et al.* 2020).

O HPV é o principal agente microbiano responsável pelo desenvolvimento do cancro do colo do útero e também está relacionado ao carcinoma da vulva, do pênis, do ânus e da orofaringe. O HPV é transmitido por contacto pele a pele ou mucosa com mucosa e entra no corpo por trauma cutâneo ou mucoso. O HPV infeta células epiteliais por interação com recetores de superfície celular, como a integrina $\alpha 6$, que é abundante em células basais e células estaminais epiteliais. Atualmente mais de 200 tipos de HPV foram totalmente sequenciados (Egawa *et al.* 2015).

O HPV é a infeção sexualmente transmissível (IST) mais comum no mundo. A maioria das infeções por HPV são eliminadas de forma rápida e efetiva pelo hospedeiro. No entanto, pode haver a presença do vírus, mas sem lesão detetável por citologia e por colposcopia conforme descrito na Figura 1.3. É a infeção latente. O exame de Papanicolau (Pap) pode ser normal. Em pessoas imunodeprimidas, pode haver ação viral sobre as células epiteliais resultando em lesões, muitas vezes persistentes, em especial com subtipos HPV de alto risco (HR-HPV – *high risk HPV*) que podem burlar o sistema imunitário e levar ao cancro cervical (Bruni *et al.* 2010).

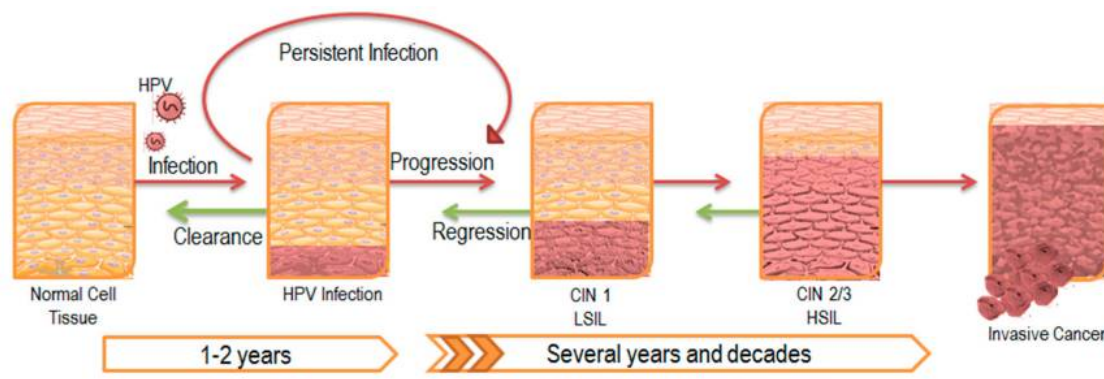


Figura 1.3 - Progressão e persistência da infecção por HPV. CIN, neoplasia intraepitelial central (*central intraepithelial neoplasia*); LSIL, lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (*low-grade squamous intraepithelial lesions*); HSIL, lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (*high-grade squamous intraepithelial lesions*) (Adaptado de Shanmugasundaram and You 2017).

O HPV geralmente tem mecanismos para evitar a sua detecção pelo sistema imune, mas é eliminado por meio de uma resposta mediada por células. A duração média da infecção pelo HPV é de 8 meses, podendo variar de acordo com o tipo. Os tipos oncogénicos de HPV possuem como estimativa 13 meses e, os não oncogénicos, 8 meses (Giannaki *et al.* 2013).

Os HPV podem ser classificados em dois grupos, que são eles mucosotrópicos e cutaneotrópicos. Os HPV são classificados em duas subcategorias principais, dependendo do local da infecção primária. Os HPV alfa geralmente infetam epitélios genitais e são ainda designados como de alto e de baixo risco, dependendo da sua capacidade de induzir cancro. Os HPV de alto risco, que são mais frequentemente associados a cancro genital maligno, incluem HPV 16, 18, 31, 33 e 45. Pelo contrário, os HPV de baixo risco, como o HPV 6 e 11, estão principalmente associados a papilomas benignos conforme descrito pela Tabela 1.1. Embora mais de duzentos tipos de HPV tenham sido identificados, dois tipos de alto risco, o HPV 16 e o HPV 18, são responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de cancro cervical (Giannaki *et al.* 2013).

Tabela 1.1 - Grupos de baixo e de alto risco do HPV (Adaptado de Ferreira *et al.* 2020).

Grupo	Tipo de lesão	Tipo de HPV
Alto risco	Neoplasia intraepitelial e cancro cervical	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 68, 73, 82
Baixo risco	Neoplasia intraepitelial ou verrugas genitais	6, 11, 40, 12, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73, 81

1.2.1 Persistência da Infecção pelo HPV

O genoma do HPV possui seis genes iniciais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), dois genes tardios (L1 e L2), juntamente com uma região não codificante. Os genes iniciais E6 e E7 são importantes devido o seu papel na inativação de genes supressores de tumor e de genes responsáveis pela progressão oncogénica. Os demais genes iniciais desempenham importantes funções na replicação viral, manutenção do genoma viral e regulação transcricional. Estes processos mencionados são de grande importância para permitir a persistência pela infecção por HPV (McLaughlin-Drubin and Münger 2009).

Diversos fatores de risco podem impedir a depuração do HPV. Considera-se que são importantes variáveis de risco para infecção e persistência viral fatores genéticos e estilo de vida. Estudos mostram que o consumo de álcool e o tabagismo também são fatores de risco para infecção persistente pelo HPV no trato oral e genital (H. Y. Oh, Kim, Seo, Lee, *et al.* 2015; Rositch *et al.* 2013).

De entre as características genéticas que se associam com uma predisposição à persistência de infecção pelo HPV, o antígeno leucocitário humano (HLA), por possuir alelos que parecem ser menos eficientes na eliminação do vírus, leva ao agravamento do quadro podendo evoluir para um cancro cervical (Wank and Thomssen 1991).

Estudos sugerem que a persistência na infecção pelo HPV está relacionada com a coinfeção de tipos diferentes de HPV, mas até o momento não foi traçada uma relação direta da coinfeção com a persistência da infecção (K. K. Thomas *et al.* 2000).

Além disso, verificou-se que variantes dentro do tipo específico de HPV também podem se associar a infecção persistente. Por exemplo recentemente descobriu-se que três das seis variantes do HPV 16 E6 estavam associadas à infecção persistente; além disso, das nove variantes do HPV 16 E2, duas estavam ligadas à infecção persistente. Embora não esteja claro no momento como essas mutações afetam a persistência do HPV, foi proposto que elas podem estar ligadas à capacidade do vírus de escapar do sistema imunológico (Zhang *et al.* 2015).

Na infecção persistente por HPV, pode haver um ambiente singular de instabilidade genómica que aumenta a probabilidade de integração do genoma viral com o genoma humano. Em aproximadamente 75% das amostras de células colhidas em biópsias de carcinoma cervical, tem o material genético do HPV16 integrado ao genoma do hospedeiro. No entanto, a presença de carcinomas com apenas HPV episomal e sem integração detetável do HPV implica que a progressão para carcinoma não requer integração do genoma do papilomavírus. No entanto, é interessante notar que a expressão genica e os padrões de metilação do DNA diferem entre os cancros com

genomas de HPV integrados e não integrados, sugerindo que mecanismos oncogênicos distintos podem desempenhar um papel em cada cenário (Parfenov *et al.* 2014).

1.2.2 Ciclo do Papilomavírus Humano – HPV

O HPV infeta células da parte basal do tecido epitelial, chamadas células tronco basal, essas células têm processo de divisão celular ativa. A camada basal é protegida por diversas camadas de células diferenciadas, sendo necessário microferimentos para que o vírus chegue a essas células basais (Burd and Dean 2016). Outra possibilidade de infecção pelo vírus seria em células de alta atividade mitótica, como as células metaplásicas de reparo. Também as células juncionais descritas por Herfs e colaboradores (2012) são células que podem ser infetadas e afetadas pelo vírus com possibilidade de lesão intraepitelial e carcinoma (Herfs *et al.* 2012; Richards *et al.* 2006).

O reconhecimento de L1 dá-se na superfície da célula, começa uma cascata de modificações estruturais que são necessárias para a endocitose do virião. Enquanto o HPV se desloca ao longo da via endossômica, L1 se desliga do genoma viral e L2 orquestra a saída viral dos endossomos (Richards *et al.* 2006).

Durante o rompimento do envelope nuclear na mitose, os complexos de DNA viral de L2 são doados ao núcleo. Posteriormente a entrada nuclear, a transcrição prematura do vírus é iniciada com a devida expressão das proteínas iniciais E1 e E2 que são fatores fundamentais para a replicação do DNA viral, pois essas proteínas são as recrutadoras da replicação do DNA celular (Aydin *et al.* 2014). Além do exposto anteriormente, o E2 é crítico para a transcrição uma vez que possui atividade regulatória de *Splicing* que controlam o processamento do pré-mRNA viral. E1, E2, E6 e E7 são as proteínas mais precoces e são encontradas nas camadas basais do epitélio, enquanto E5 e E4 só começam a ser detetadas nas camadas supra basais como pode ser ilustrado em Figura 1.4. (Graham 2017; Graham and Faizo 2017).

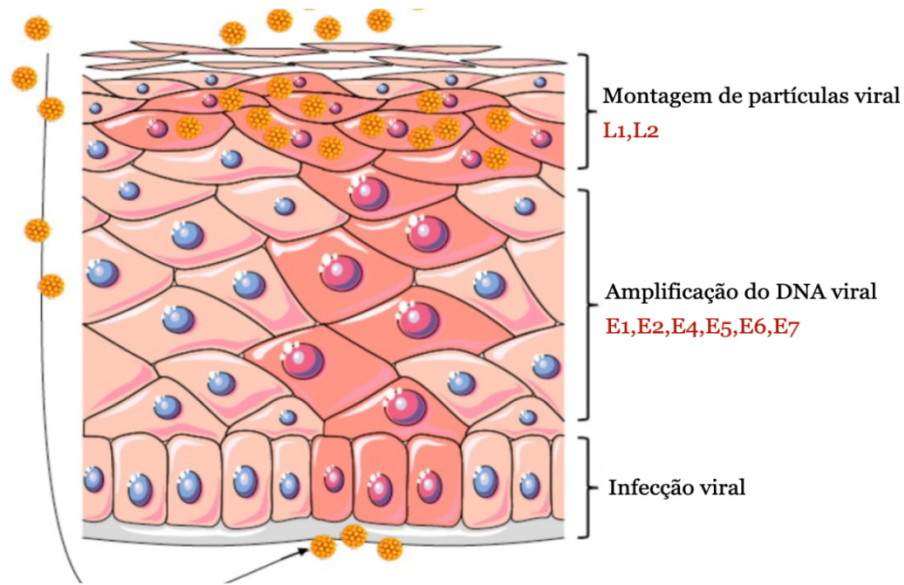


Figura 1.4 - Ciclo viral (Adaptado de Bordignon *et al.* 2017).

Estudos tem mostrado a existência de três fases de replicação do ciclo viral, fases essas denominadas de amplificação inicial, replicação de manutenção e amplificação vegetativa (Graham 2017; Kadaja *et al.* 2009; McBride 2008).

A replicação tem início na região regulatória (URR), ocasionando um aumento abrupto, mas de forma transitória das cópias do genoma viral. Posteriormente, o DNA viral é mantido de forma estável em baixos números de cópias durante a divisão celular basal. Isto é conseguido através do estabelecimento de epissomas estáveis em regiões específicas do núcleo. E2 é então responsável por amarrar o genoma viral para hospedar a cromatina, garantindo assim a sua partição bem sucedida em quantidades iguais na divisão celular (McBride 2008).

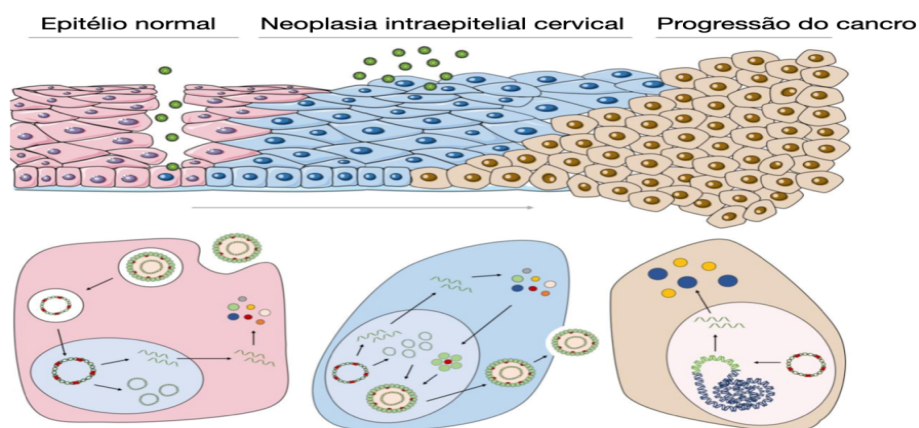


Figura 1.5 - Progressão citológica e molecular do HPV (Adaptado de Ferreira *et al.* 2020).

A infecção pelo HPV pode ficar de forma latente por longos períodos, existem descrições de latências que variam de anos a décadas conforme ilustrado na Figura 1.5. Existem inúmeros fatores que podem prolongar ou encurtar esse período, a progressão da infecção se dá através da mudança da manutenção do genoma para a replicação viral vegetativa, levando assim a produção ativa de viriões (Graham 2017; Harden and Munger 2017).

Nos epitélios não infectados, as células presentes na camada basal perdem o contacto com a membrana basal e, assim, param a divisão celular. Como consequência, inicia-se o processo de diferenciação destas células, resultando na perda da sua capacidade proliferativa. (Pyeon *et al.* 2009).

No entanto, como o HPV é altamente dependente do mecanismo das células hospedeiras para replicação e tradução do genoma viral, ele evoluiu para realizar o seu ciclo de replicação em conjunto com a diferenciação epitelial, juntamente com a expressão do gene viral. As células infectadas pelo HPV mantêm a sua capacidade de diferenciação e são capazes de se mover para as camadas epiteliais superiores. Os mecanismos que atuam nessa situação de reprogramação não são bem descritos, mas os oncogenes codificados por vírus parecem ter um papel importante nesse processo. Além disso, a amplificação vegetativa está associada a um aumento do número de cópias do genoma do HPV e também é seguida pela expressão das proteínas estruturais L1 e L2 (Graham 2017).

Nas células infectadas da camada superior do epitélio ocorre a montagem do viriões, que tem seu início no núcleo, onde dá-se o empacotamento do capsídeo e do genoma. Como o HPV é um vírus não lítico, os viriões são apenas ejetados quando as células que contêm o vírus chegam às camadas mais superficiais do epitélio (Graham 2017).

A interferência do HPV no ciclo celular que está associado à oncogênese se dá essencialmente por duas vias. As vias Rb e p53 são interrompidas pelas oncoproteínas E7 e E6 do papilomavírus humano (HPV), respectivamente. A proteína HPV E7 liga-se a Rb com alta afinidade, interrompendo a sua interação com o fator de transcrição E2F. Isso resulta na liberação e ativação de E2F, estimulando a expressão de genes da fase S e a progressão do ciclo celular. O P16INK4A é um inibidor da cinase dependente de ciclina que regula o ciclo celular ao desativar as cinases dependentes de ciclina envolvidas na fosforilação de Rb. A regulação positiva de P16INK4A é induzida pela rutura de E7 mediada por HPV, levando ao acúmulo de P16INK4A em células transformadas por HPV. A proteína HPV E6 inibe a apoptose visando a proteína supressora de tumor, p53, para degradação. Como é descrito na Figura 1.6. A inibição do p53 pelo HPV E6 promove

a proliferação celular e pode levar à instabilidade genômica e ao acúmulo de mutações somáticas (Litwin *et al.* 2017).

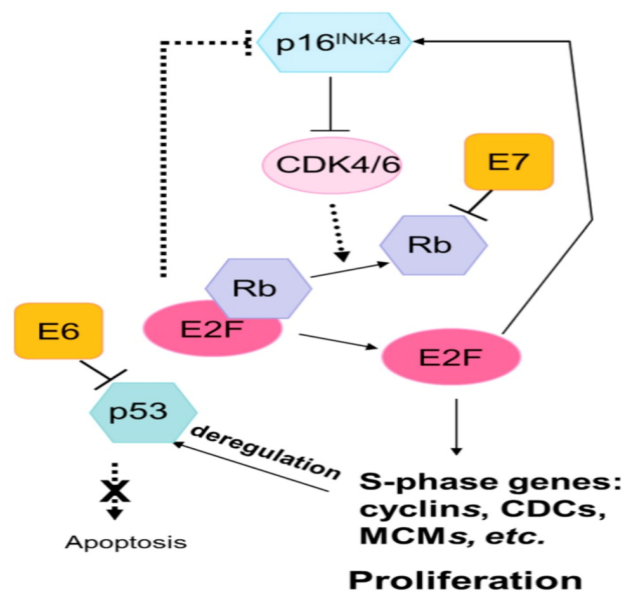


Figura 1.6 - Cascata intracelular das proteínas E6 e E7 do HPV (Adaptado de Litwin *et al.* 2017).

1.3 Lesões de Baixo e de Alto Grau

1.3.1 Epitélio Escamoso do Colo Uterino

O epitélio do trato genital é constituído por diversas camadas e níveis de maturação, cada camada consegue ser bem definida pela observação das células que as constitui e também pelo seu grau de maturação (Carmichael and Jeaffreson 1939).

As células basais são pequeninas e indiferenciadas e medem aproximadamente de 10 a 12µm de diâmetro. As células parabasais medem entre 15 e 30µm, o núcleo é vesicular com a cromatina finamente granular ocupando quase todo o citoplasma que é cianofílico. As células intermediárias têm entre 35 e 50µm e são menores do que as superficiais e maiores do que as parabasais. O núcleo é redondo ou oval, do tamanho aproximado de uma hemácia, com membrana nuclear lisa, cromatina fina e uniforme, citoplasma poligonal e cianofílico, raras vezes eosinofílico. As células superficiais são as células mais diferenciadas do epitélio escamoso não queratinizado. O seu diâmetro varia de 45 a 50µm, o seu núcleo é pequeno e picnótico, e o seu citoplasma possui coloração mais eosinofílica do que acidofílica (Carmichael and Jeaffreson 1939; Gupta and Sodhani 2000; Payandeh and Koss 2003).

Um dos exames mais específicos e de fácil detecção para lesões pré-cancerosas e cancerosas é a citologia cérvico-uterina, que consegue detetar e prevenir um cancro invasivo com anos de antecedência, essa prevenção ocorre, pois é identificado lesões precursoras. Atualmente o surgimento de cancro no trato genital está associado à infeção por um ou mais dos 15 tipos de HPV oncogénico (Leroy and Boman 2003).

1.3.2 Lesão Intraepitelial Escamosa

A lesão intraepitelial escamosa aglomera o espectro de anormalidade não invasiva, associado ao HPV, tendo uma variação que se estende de alterações celulares que são de infeção transitória por HPV até alterações celulares sugestiva de lesões de alto grau, consideradas precursoras do cancro escamoso invasivo. No sistema de Bethesda essa divisão abrange as categorias de: Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (LSIL) e Lesão Intraepitelial de Alto Grau (HSIL). As LSIL compreendem efeito citopático do HPV (coilocitose), displasia leve ou neoplasia intraepitelial cervical (NIC 1) e as HSIL abrangem displasia moderada, grave e carcinoma *in situ* ou NIC 2,3 como é evidenciado pela tabela 1.2. (Solomon *et al.* 2002; Solomon and Nayar 2004).

Tabela 1.2 – Classificação dos diferentes sistemas de classificação de anormalidades escamosa da citologia cervical (Adaptado de Vooijs, Bulten, and Erp 2008).

Papanicolau	Displasia	Nic	Bethesda
Classe 1	Displasia leve	Nic 1	Atipia em células escamosas Lesão intraepitelial
Classe 2	Displasia leve	Nic 1	Atipia em células escamosas Lesão intraepitelial
Classe 3	Displasia moderada/ severa	Nic 2	Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL)
Classe 4	Carcinoma <i>in situ</i>	Nic 3	Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL)
Classe 5	Carcinoma	Carcinoma	Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) Carcinoma

1.3.3 Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL)

As lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) são consideradas como lesão menor e são encontradas em 2% de todas as amostras de exame de Papanicolau, estando associadas a tipos de HPV de baixo e alto risco como ilustrado na Figura 1.7 (E. Cibas and Ducatman 2009).

Os critérios morfológicos para diferenciação da coilocitose de uma displasia leve ou NIC 1 mudam de acordo com os pesquisadores e não têm significado clínico. Ambas as lesões têm em comum, tipos de HPV similares, sendo o comportamento biológico e tratamento clínico igual, dando assim uma denominação comum de LSIL (Wright, Kurman, and Ferenczy 2002).

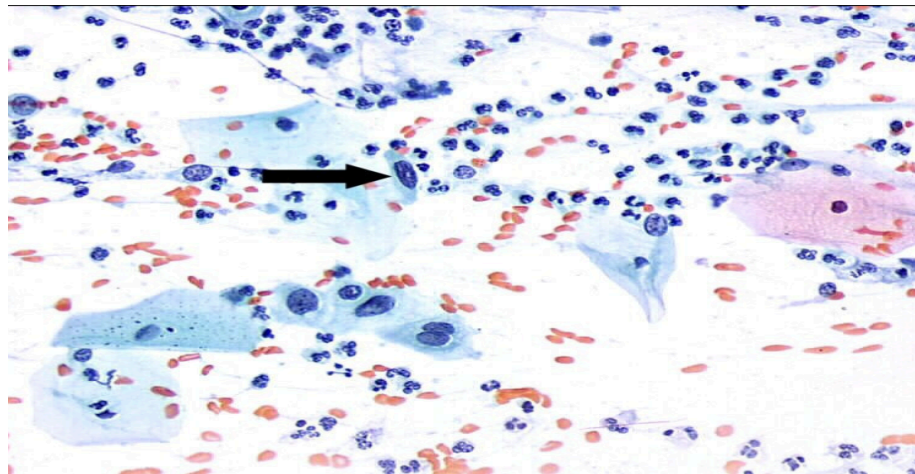


Figura 1.7 - Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau. A seta indica um núcleo hiper cromático (Pires 2009).

1.3.4 Lesões Intraepiteliais Escamosas de Alto Grau (HSIL)

As lesões epiteliais escamosas de alto grau (HSIL) possuem um grande poder de reestruturação do epitélio, que leva a uma variação nas características citoplasmáticas, tamanho celular e graus de alteração do núcleo, podendo variar nas características citoplasmáticas, tamanhos celulares e alterações nucleares como pode ser visualizado na figura 1.8. (Koss 2006).

As lesões de baixo grau são transitórias e a maior parte regride ao normal em curto período, enquanto a lesão de alto grau tem probabilidade muito maior de progredir para uma neoplasia invasiva, embora algumas também possam regredir ou persistir (Schiffman *et al.* 2007).

As alterações citológicas ocorrem em células menores e menos maduras do que as encontradas na LSIL, ocorrendo o achado em células isoladas ou em agregados do tipo sincicial (Schiffman *et al.* 2007).

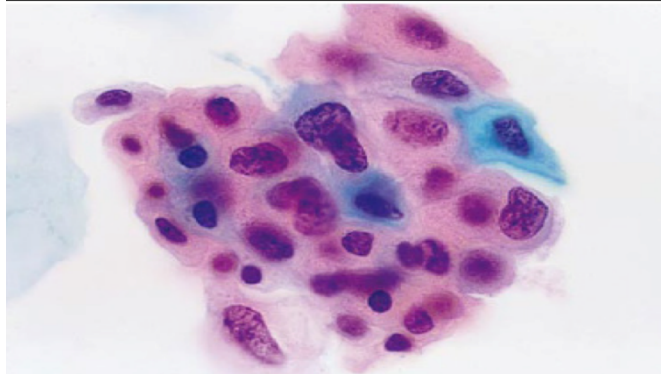


Figura 1.8 - Lesão intraepitelia escamosa do tipo de alto grau (Adaptado de Cibas and Al 2009).

O tamanho celular é do tipo basal bem pequena, a hiper Cromasia do núcleo é seguida por variações no tamanho e forma nuclear, a variação no tamanho das células é mais proeminente do que na LSIL, mas a área do citoplasma encontra-se diminuída levando a uma elevação da relação núcleo citoplasma, a cromatina tem um aspeto que pode variar entre finamente e espessamento granular e com distribuição regular o contorno da membrana nuclear é bastante irregular e frequentemente mostra entalhes proeminentes ou sulcos (Schiffman *et al.* 2007).

1.4 Biofilme

O biofilme é um aglomerado tridimensional de bactérias com complexa arquitetura que se forma em superfícies e é envolto por uma rede de polissacarídeos hidratados, proteínas e materiais genéticos dos componentes do biofilme. Com a persistência bacteriana, ocorre aumento da resistência aos antibióticos e esse facto pode ser frequentemente atribuído a formação do biofilme em tecidos vivos ou implantes no seu hospedeiro (Dufour, Leung, and Lévesque 2012).

A prevalência de infeção mediada por biofilme é muito rápida e é observada em periodontite, endocardite, osteomielite e infeções do trato urinário (Dufour, Leung, and Lévesque 2012; Nandakumar *et al.* 2012).

As bactérias do biofilme são altamente resistentes à antibioticoterapia devido à matriz de exopolissacarídeos (EPS) que fornece ancoragem e suporte, e as tornam menos

suscetíveis a esses agentes terapêuticos. Os medicamentos atuam efetivamente em bactérias de flutuação livre que são destacadas do biofilme, mas não naquelas incorporadas na matriz, levando à recorrência da infecção. A falha da terapia antimicrobiana, em geral é atribuída aos altos níveis de bactérias resistentes a medicamentos incorporados no biofilme. Mesmo uma bactéria sésil altamente sensível, sem nenhuma constituição genética inerente à resistência a antibióticos, desenvolve 1000 vezes mais resistência quando incorporada num biofilme. O motivo da resistência pode ser atribuído a vários fatores (Stewart and Costerton 2001).

O processo de formação do biofilme dá-se em quatro passos que são eles, (I) ligação inicial de micróbios a uma superfície ou outra, (II) formação de microcolônias, (III) maturação do biofilme e (IV) dispersão do biofilme (Stewart and Costerton 2001).

Os diferentes estágios do biofilme incluem fisiologia bacteriana e respostas fenotípicas sugestivas da existência de uma biologia única de biofilme que não é encontrada para bactérias planctônicas (Stewart and Costerton 2001).

A mudança do estilo de vida bacteriano planctônico solitário para o estilo de vida biofilme comum envolve uma mudança nas bactérias, de modo que iniciam a produção de adesinas e compostos da matriz extracelular que os interconectam no biofilme como descrito pela figura 1.9. A matriz extracelular de biofilme serve como um andaime que possui uma função essencial de conexão célula a célula em biofilmes e desempenha um papel em vários processos, incluindo fixação celular, interações células a célula e tolerância antimicrobiana (Friedman and Kolter 2004; Whitchurch *et al.* 2002).

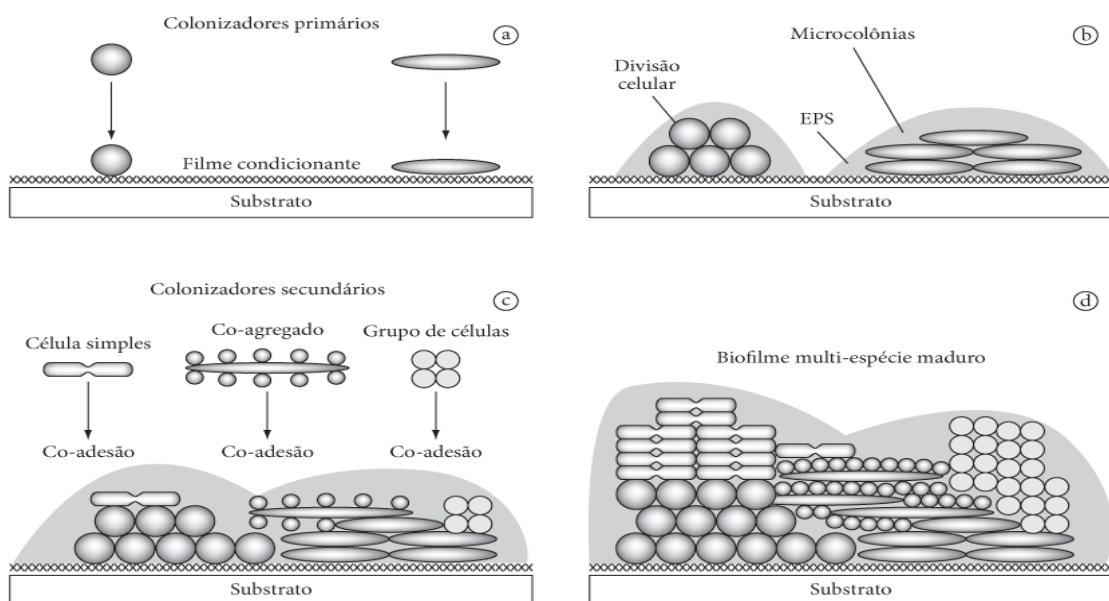


Figura 1.9 - Diagrama ilustrativo das etapas de formação de um biofilme (Adaptado de Rickard *et al.* 2003).

Diversas bactérias podem crescer na presença de agentes microbianos bactericidas ou bacteriostático numa concentração que normalmente seria inibitória ao crescimento (Cox and Wright 2013).

A resistência é tipicamente medida em culturas planctônicas usando a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração do agente microbiano que inibe o crescimento do microrganismo como pode ser exemplificado pela figura 1.10. (Cox and Wright 2013).

Frequentemente a resistência é considerada e atribuída a mutações ou trocas de elementos genéticos da resistência a antibióticos (resistência adquirida), embora a resistência também possa ser intrínseca, portanto, dependente de genes do tipo selvagem e propriedades inatas da célula (Cox and Wright 2013).

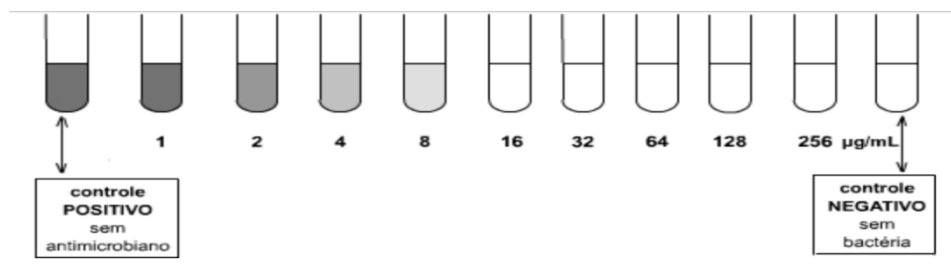


Figura 1.10 – Representação esquemática do teste de macrodiluição em tubo, após a inoculação e incubação (Adaptado de Murray and Baron 2003).

Diversos tipos de defesa são utilizados pelas bactérias e isso não seria diferente na presença do biofilme, as bactérias mais externas do biofilme continuam de forma ininterrupta a sua atividade contra as ações dos antibióticos. Diversas ações são tomadas, mas de forma direta será exposto quatro formas de ação contra os fármacos, que são elas, alteração da permeabilidade, alteração do sítio de ação, bomba de efluxo e mecanismos enzimáticos como pode ser ilustrado pela figura 1.11. (Lewis 2008).

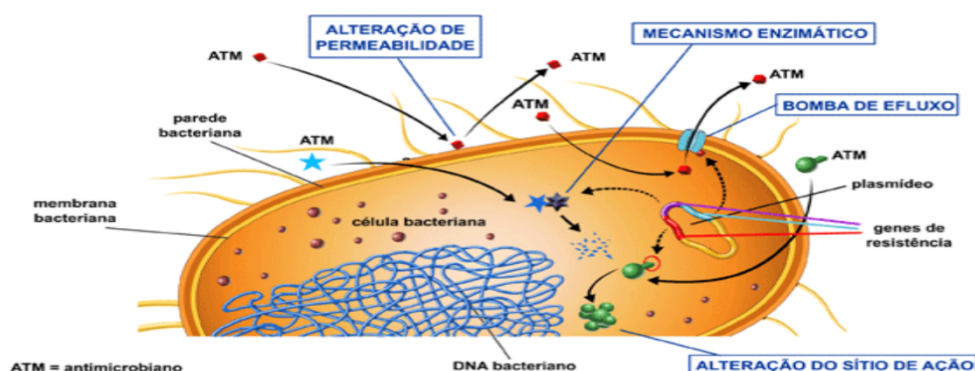


Figura 1.11 - Métodos de defesa utilizado pelas bactérias contra os fármacos (Adaptado de Peterson and Kaur 2018).

1.5 Relação do HPV com a Microbiota Local e Seus Efeitos

Com o advento da vacinação contra o HPV, ocorreu uma redução importante no número de casos nos países desenvolvidos, mas o cancro de colo de útero ainda persiste entre os cânceros mais comuns, sendo atualmente o quarto mais relatado nas mulheres (Bray *et al.* 2018; Carter, Ding, and Rose 2011).

Após a infecção pelo HPV, a formação neoplásica não progride de maneira uniforme, displasia pré-cancerosa pode regredir sem tratamento por motivos incertos. Com a persistência de infecção ocorre um evento que ainda não foi bem desenhado, o sistema imune local é suprimido e a resposta celular é dificultada assim como a eliminação e a destruição das células anormais são diminuídas (Bray *et al.* 2018; Carter, Ding, and Rose 2011).

O HPV suprime a produção de citocinas de forma severa, o que leva a alteração da dinâmica microbiana local (Moerman-Herzog and Nakagawa 2015).

Diversos grupos de estudo têm demonstrado que existe uma forte associação entre os mediadores imunitários do sistema genital com a variação numérica de *Lactobacillus* na carcinogênese cervical (Karim *et al.* 2013).

Mudanças ambientais severas ou disbiose podem alterar a microbiota dominada por *Lactobacillus* associada à saúde para comunidades anaeróbias e microaerofílicas complexas na vaginose bacteriana (BV) (Łaniewski *et al.* 2018).

Além disso, alterações na fisiologia celular causada por infecção por HPV e doença neoplásica podem transformar a dinâmica do microambiente cervicovaginal. Como tal, as secreções das células cancerígenas, bem como os produtos de fermentação microbiana, poderiam modular o microambiente e afetar o metabolismo hospedeiro e microbiano (Srinivasan *et al.* 2015).

A composição da microbiota vaginal e a persistência pelo HPV vêm sendo estudado para entender a relação íntima que se desenvolve para a progressão da infecção, estudos vem a sugerir que a microbiota que possui maiores níveis de *L. gasseri* estão associados a uma eliminação mais precoce da infecção aguda proveniente do HPV (Heiden, Cantley, and Thompson 2009).

A presença de lesões teciduais estão associadas a presença de vaginose bacteriana e à diminuição da abundância relativa de *Lactobacillus sp.* Foi observado que na literatura existe uma relação entre a diversidade da microbiota local e a persistência do HPV assim como uma possibilidade maior de desenvolvimento de lesões epiteliais. Mulheres com

negatividade para o HPV possuem uma percentagem menor de desenvolvimento de lesão. A partição de *L. iners* e *Lactobacillus sp.* apresentaram níveis mais altos de HSIL quando comparados àqueles com diversas taxas não classificadas de *Lactobacillus*, *L. iners*, *Bifidobacteriaceae*, *Clostridiales* e *Allobaculum* (Audirac-Chalifour *et al.* 2016; Brotman *et al.* 2018; A Mitra *et al.* 2015; H. Y. Oh, Kim, Seo, Kong, *et al.* 2015; Piyathilake *et al.* 2016).

Capítulo 2

Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar tipos diferentes de microbiota cervical e características identificadas no esfregaço de material residual de citologia em meio líquido e associação com HPV e *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a prevalência de tipo de microbiota utilizando escore de Nugent em material residual de citologia em meio líquido de mulheres com e sem sintomas;
- Estudar as características dos esfregaços corados por Gram, como presença de células imaturas, de células inflamatórias, de citólise, de heterogeneidade e quantidade de morfotipos bacterianos e capacidade de formar biofilme conforme o tipo de microbiota;
- Avaliar a presença de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano (com genotipagem) por reação em cadeia de polimerase conforme o tipo de microbiota;
- Avaliar a presença de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a heterogeneidade dos morfotipos bacterianos estudados em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram;
- Avaliar a presença de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a quantidade dos morfotipos bacterianos estudados em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram;

- Avaliar a presença de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a identificação de morfotipos formando biofilmes em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram;
- Avaliar a presença de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a o tipo de vaginose bacteriana (VB). VB1 sem bacilos curvos, VB2 com bacilos curvos.

Capítulo 3

Materiais e Metodologia

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

- Centrífuga, rotina 420, hettich;
- Microscópio, MshOt;
- multiplex Allplex™ STI Essentials Assay, Seegene;
- Xpert HPV, Ceiphed;

3.1.2 Materiais

- Cubetas;
- Delimitador;
- Lâminas de microscopia;
- Lamínulas de microscopia;
- Óleo de imersão de microscopia;
- Pipetas volume variável;
- SurePath liquid-based Pap test, BD;

3.1.3 Reagentes

- Álcool absoluto, Itajá;
- Fuscina (1%), Laborclin;
- Lugol (5%), Laborclin;
- Violeta de genciana (1%), Laborclin.

3.2 Metodologia

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Universitário Christus (Unichristus), atendendo a Resolução 510 de 07 de abril de 2016, com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 24071519.9.0000.5049.

3.2.1 Localização do Estudo

As amostras foram recolhidas em diversos consultórios ginecológicos que possuem convênio estabelecido com o laboratório Professor Doutor Eleutério da Costa. Todas as amostras moleculares do devido estudo foram realizadas no laboratório supracitado (exceto a análise de RT-PCR (PCR em tempo real) do painel de Infecção Sexualmente Transmissível (IST). As leituras assim como a confecção das lamínas pelo método de Gram foram realizadas no laboratório anteriormente citado.

3.2.2 Critérios para Seleção de Pacientes

Os pacientes participantes desta investigação foram escolhidos respeitando os critérios preestabelecidos, onde são delimitados aos pacientes dentro das suas atuais condições de saúde assim como condições do material recolhido.

3.2.3 Critérios de Inclusão de Pacientes

Serão incluídas amostras em meio líquido de citologia de colo uterino dos arquivos do laboratório Professor Doutor Eleutério da Costa com material suficiente para confecção de novos esfregaços para coloração por Gram e que tenham sido submetidos a investigação por RT-PCR para o Papilomavírus Humano (HPV).

3.2.4 Critério de Exclusão de Pacientes

Serão excluídas amostras oriundas de gestantes, imunodeprimidas, pacientes em uso de quimioterapia ou imunoterapia e casos com material insuficiente para confecção de esfregaço.

3.3 Métodos de Análise do Material

3.3.1 Detecção do Papilomavírus Humano - HPV

Técnica utilizada para identificação do subtipo do HPV. As amostras foram agitadas por vários segundos e o volume total de 1 ml de suspensão de pellets enriquecidos dos frascos de coleta *SurePath* foi colocado no cartucho *Xpert HPV* e posteriormente carregado no instrumento *Cepheid Xpert Diagnosis* (figura 3.1) que usa uma RT-PCR de segunda geração para detecção de infecção por HPV de alto risco em células escamosas atípicas cervicais de significado indeterminado.



Figura 3.1 – Máquina *GeneXpert* utilizada para detecção do HPV (Adaptado de Cepheid 2020).

3.3.2 PCR em Tempo Real para o Painel de Infecção Sexualmente Transmissível

O painel de IST é composto por seis microrganismos que são eles: *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*. O devido exame é realizado utilizando a mesma amostra de meio líquido *SurePath* que é utilizada para o HPV no exame anterior. O exame foi realizado utilizando o ensaio de RT-PCR *multiplex Allplex™ STI Essentials Assay* (figura 3.2 e 3.3) que possui a capacidade de analisar 7 patógenos simultaneamente (sendo utilizado apenas 6 para o presente estudo), que são os principais patógenos de infecções sexualmente transmissível.

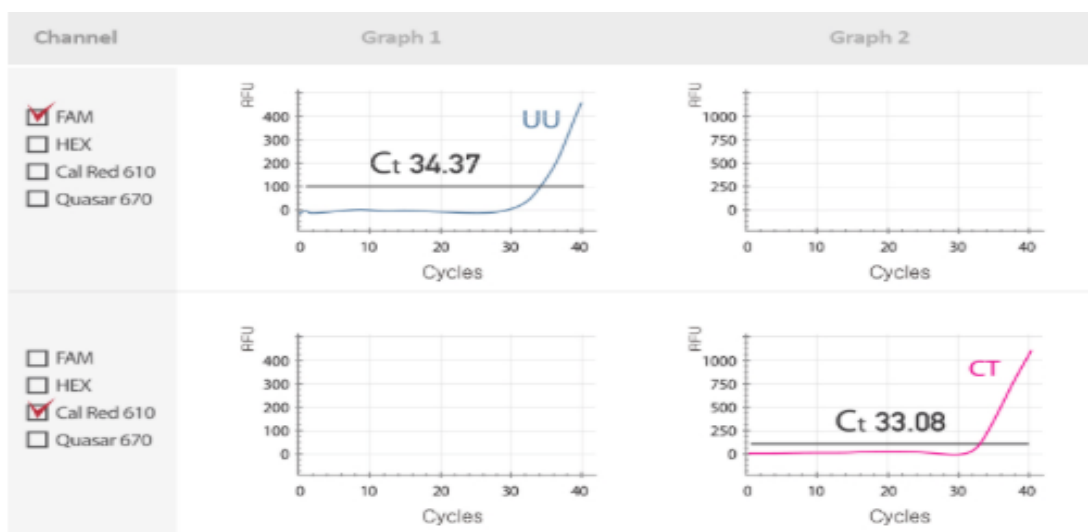


Figura 3.2 - Exemplificação de resultados obtidos do painel de IST (Adaptado de Seegene Brazil 2019).

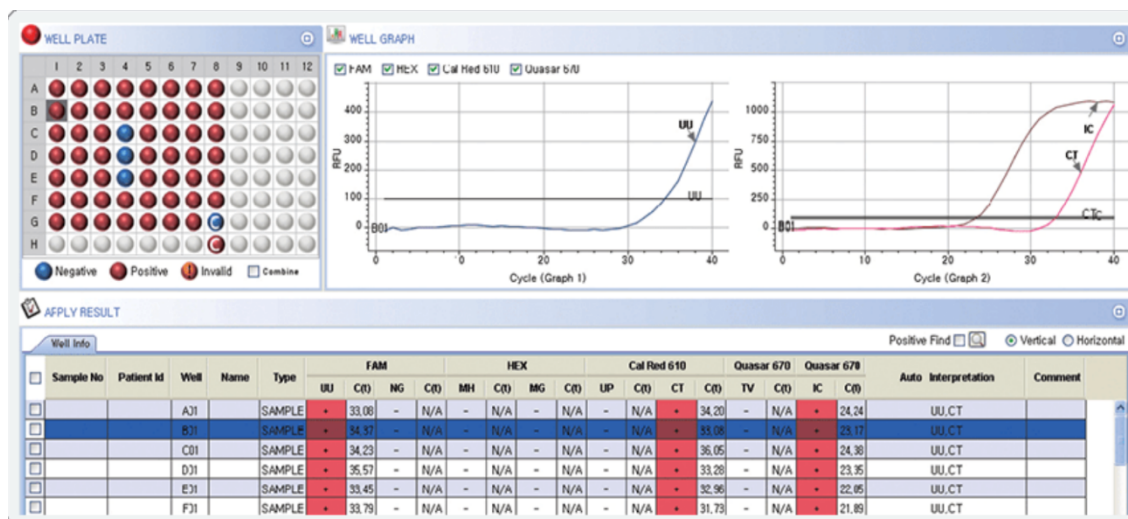


Figura 3.3 - Exemplificação do software utilizado para a obtenção dos resultados da pesquisa do painel de IST (Adaptado de Seegene Brazil 2019).

3.3.3 Técnica de Gram

Após o recebimento da amostra conservada em meio líquido *SurePath* é realizada uma centrifugação por dez minutos a 2500 rpm, após utilização da centrífuga o sobrenadante deve ser descartado e em seguida o material deve ser recomposto com 4 ml de líquido preservante, em seguida com uma pipeta de 800 µl deve-se realizar seis a oito sucções e liberação do material para que o mesmo seja homogêneo, após passo descrito deve-se liberar 800 µl do material na lâmina, onde a mesma já está equipada pelos delimitadores, em seguida deve ser adicionado álcool absoluto por dois minutos e o devido passo deve ser realizado três vezes seguidas com o intuito de fixar o material na lâmina, em seguida deve ser retirado os delimitadores e observar se houve a aderência do material a lâmina em seguida deve ser executado a coloração de Gram, que será descrita posteriormente.

Mergulhar a lâmina por 1 minuto na cubeta contendo violeta de genciana; lavar a lâmina em água; colocar a lâmina na cubeta contendo Lugol e deixar por 1 minuto; lavar a lâmina em água; introduzir a lâmina em uma cubeta contendo álcool absoluto por 15 segundos; introduzir a lâmina em uma cubeta contendo fuscina e deixar por 30 segundos.

Capítulo 4

Resultados

Foram estudados 179 esfregaços corados por Gram de mulheres com idade média de 36 anos no laboratório Professor Doutor Eleutério da Costa que se submeteram simultaneamente a pesquisa e genotipagem de HPV por PCR em tempo real (RT-PCR) e pesquisa por RT-PCR de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Trichomonas vaginalis*.

Os casos foram divididos conforme o escore de Nugent aplicado a esfregaços corados pelo método de Gram, em microbiota cervical normal (escores de 0 a 3): 100 casos (55,86%) descrito na figura 4.1 A; microbiota intermediária (escore de 4 a 6): 51 casos (28,5%) descrito na figura 4.1 B e sugestivo de disbiose (escore de 7 a 10): 28 casos (15,64%) descrito na figura 4.1 C e D.

No grupo de microbiota normal foi identificado morfotipo de *Candida* sp em 5 casos (5%). O mesmo foi observado em 4 casos (7,8%) no grupo intermediário e em 4 casos (14,3%) no grupo de disbiose ou vaginose bacteriana (VB). Neste último grupo a presença de *Candida* sp ocorreu apenas no tipo 1 de VB, ou seja, sem identificação de bacilos curvos Gram negativos (sugestivos de *Mobiluncus* sp). Este morfotipo bacteriano foi identificado em 8 casos de VB (28,6%).

Estudo das características dos esfregaços corados por Gram em casos de normalidade, microbiota intermediária e vaginose bacteriana (VB) é mostrado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Estudo das características dos esfregaços corados por Gram, como presença de células imaturas, de células inflamatórias, de citólise, de heterogeneidade e quantidade de morfotipos bacterianos e capacidade de formar biofilme, em casos categorizados pelo escore de Nugent como de normalidade (0 a 3), microbiota intermediária (4 a 6) e vaginose bacteriana (VB) (7 a 10).

	Normal (escore 0 a 3)	Intermediária (escore 4 a 6)	VB (escore 7 a 10)	p*
Células imaturas	12 (12%)	6 (11,76%)	0	ns
Células inflamatórias				
ausente	47 (47%)	20 (39,2%)	10 (35,71%)	ns
poucas	38 (38%)	22 (43,14%)	11 (39,29%)	ns
moderada/intensa	15 (15%)	9 (17,65%)	7 (25%)	ns
Citólise	10 (10%)	1 (1,96%)	0	ns
Heterogeneidade				
Baixa	6 (6%)	8 (15,69%)	0	ns
Moderada	73 (73%)	32 (62,75%)	7 (25%)	< 0,0001
Grande	21 (21%)	11 (21,57%)	21 (75%)	< 0,0001
Quantidade				
Escassa/pouca	44 (44%)	36 (70,59%)	3 (10,71%)	0,0009
Moderada/Alta	56 (56%)	15 (29,41%)	25 (89,29%)	
Biofilme	8 (8%)	5 (9,8%)	19 (67,86%)	<0,0001

* teste exato de Fisher para intervalo de confiança de 95%.

Observe que a heterogeneidade da microbiota, a quantidade e capacidade de formação de biofilmes são significativamente maiores em quadros de VB.

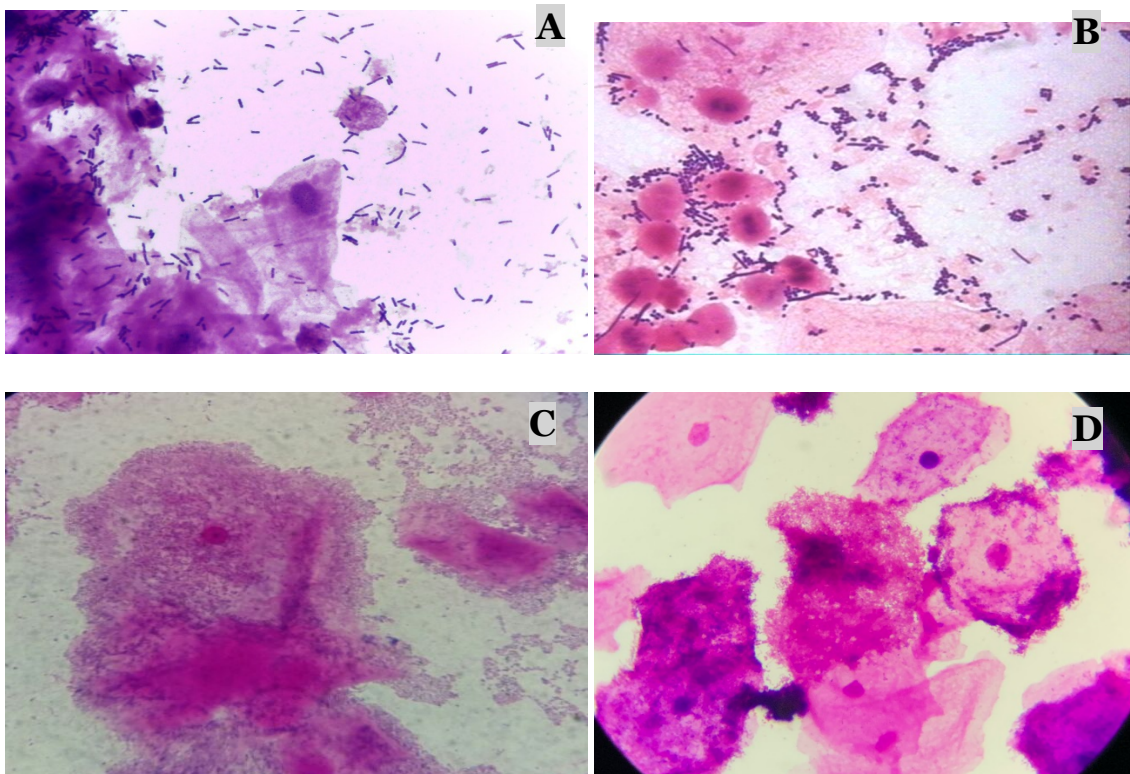


Figura 4.1 – A) Exemplo de escore de Nugent 0 a 3 (normal) (Gram 1000x); B) Exemplo de escore de Nugent 4 a 6 (intermediária) (Gram 1000x); C) Exemplo de escore de Nugent 7 a 10 (vaginose bacteriana). Neste caso tipo 1 (Gram 1000x); D) Exemplo de vaginose bacteriana (escore de Nugent 7 a 10) tipo 2, onde de observam os bacilos curvos Gram negativos (Gram 1000x).

A pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano (com genotipagem) por RT-PCR em casos de normalidade ilustrado na figura 4.2, microbiota intermediária descrito na Figura 4.3 e vaginose bacteriana (VB) é demonstrada na Tabela 4.2 e na Figura 4.4.

Tabela 4.2 – Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano (com genotipagem) por reação em cadeia de polimerase em tempo real em casos de normalidade, microbiota intermediária e vaginose bacteriana (VB).

	Normal (n = 100)	Intermediária (n = 51)	VB (n = 28)	p*
<i>Chlamydia trachomatis</i>	0	0	1 (3,57%)	ns
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0			
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0			
				<
<i>Mycoplasma hominis</i>	0		7 (25%)	0,0001
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1 (1%)	2 (3,9%)	1 (3,57%)	ns
<i>Trichomonas vaginalis</i>	0			
HPV				
16	2 (2%)			ns
18/45	3 (3%)		1 (3,57%)	ns
AR	13 (13%)	5 (9,8%)	3 (10,71%)	ns
AR e 16		1 (3,9%)		
AR e 18/45			1 (3,57%)	ns

* teste exato de Fisher para intervalo de confiança de 95%.

VB: vaginose bacteriana; HPV: Papilomavírus humano; AR: alto risco; *M. hominis* foi o único agente significativamente mais observado em casos de vaginose bacteriana.

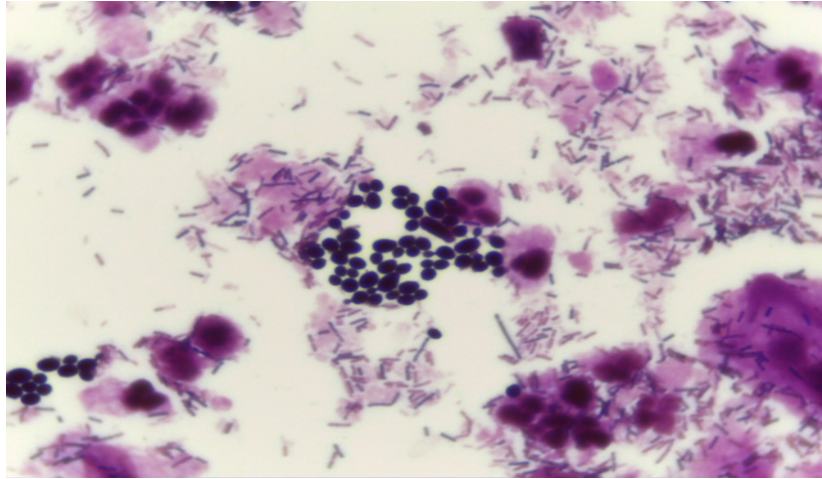


Figura 4.2 – Identificação de morfotipo de *Candida sp* em caso de microbiota considerada normal pelo escore de Nugent (0 a 3) (Gram 1000x).

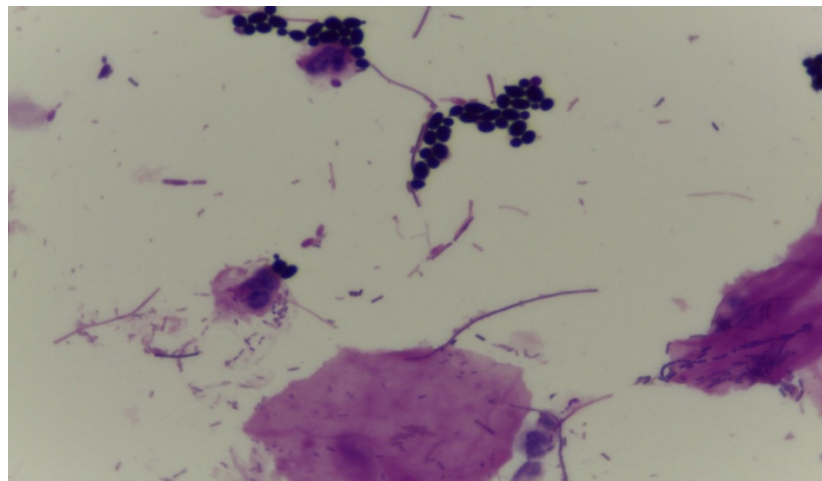


Figura 4.3 – Identificação de morfotipo de *Candida sp* em caso de microbiota considerada intermediária pelo escore de Nugent (4 a 6) (Gram 1000x).

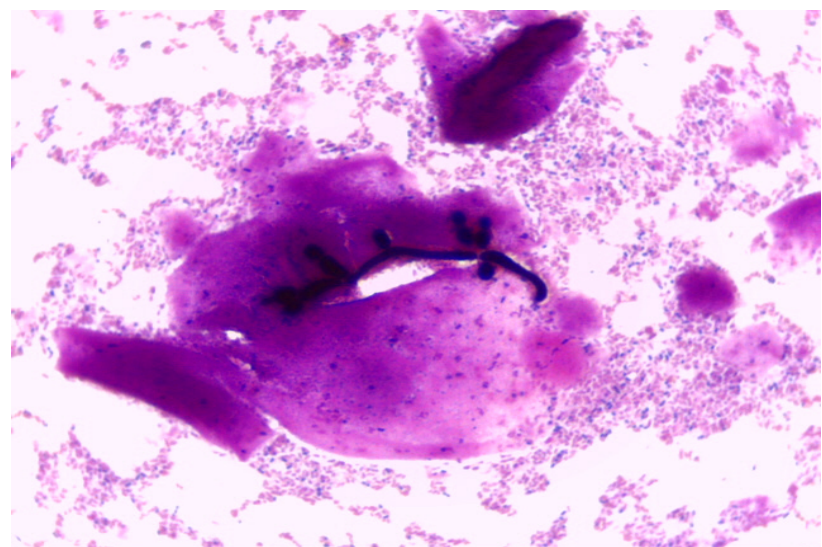


Figura 4.4 – Identificação de morfotipo de *Candida sp* em caso de microbiota considerada vaginose bacteriana pelo escore de Nugent (7 a 10) (Gram 1000x).

A pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano (com genotipagem) por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a heterogeneidade dos morfotipos bacterianos estudados em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram é demonstrada na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a heterogeneidade dos morfotipos bacterianos estudados em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram.

HETEROGENEIDADE DE MORFOTIPOS BACTERIANOS				
	BAIXA (n = 14)	MODERADA (n = 112)	ALTA (n = 53)	p*
<i>Chlamydia Trachomatis</i>	-	1 (0,89%)	2 (3,77%)	ns
<i>Neisseria Gonorrhoeae</i>	-	-	-	
<i>Mycoplasma Genitalium</i>	-	-	-	
<i>Mycoplasma Hominis</i>	-	2 (1,78%)	5 (9,43%)	ns
<i>Ureaplasma Urealyticum</i>	1 (7,1%)	1 (0,89%)	2 (3,77%)	ns
<i>Trichomonas Vaginalis</i>	-	-	-	
HPV				
16	-	2 (1,78%)	-	ns
18/45	-	4 (3,57%)	-	
			10	
AR	1 (7,1%)	10 (8,93%)	(18,87%)	ns
AR e 16	1 (7,1%)	-	-	
AR e 18/45	-	1 (0,89%)	1 (1,89%)	ns

* teste exato de Fisher para intervalo de confiança de 95%.

VB: vaginose bacteriana; HPV: Papilomavírus humano; AR: alto risco

A pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e

Papilomavírus humano (com genotipagem) por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a quantidade dos morfotipos bacterianos estudados em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram é demonstrado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a quantidade dos morfotipos bacterianos estudados em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram.

	Quantidade		
	Escassa/baixa (n = 82)	moderada/alta (n = 96)	p*
<i>Chlamydia Trachomatis</i>	1 (1,22%)	2 (2,08%)	ns
<i>Neisseria Gonorrhoeae</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma Genitalium</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma Hominis</i>	1(1,22%)	6 (6,25%)	ns
<i>Ureaplasma Urealyticum</i>	2 (2,44%)	2 (2,08%)	ns
<i>Trichomonas Vaginalis</i>	-	-	-
HPV			
16	1 (1,22%)	1 (1,04%)	ns
18/45	-	2 (2,08%)	ns
AR	7 (8,54%)	13 (13,54%)	ns
AR e 16	1 (1,22%)	-	ns
AR E 18/45	2 (2,44%)	1 (1,04%)	ns

*teste exato de Fisher para intervalo de confiança de 95%.

A pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano (com genotipagem) por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a identificação de morfotipos formando biofilme em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram é demonstrada na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a identificação de morfotipos formando biofilmes em esfregaços cervicais corados por técnica de Gram.

	Biofilme		
	ausente (n = 147)	presente (n = 32)	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2 (1,36%)	1 (3,13%)	ns
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>			
<i>Mycoplasma genitalium</i>			
<i>Mycoplasma hominis</i>	2 (1,36%)	5 (15,63%)	0,0022
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2 (1,36%)	2 (6,25%)	ns
<i>Trichomonas vaginalis</i>			
HPV			
16	2 (1,36%)		ns
18/45	3 (2,04%)		ns
AR	16 (10,88%)	5 (15,63%)	ns
AR e 16	1 (0,68%)		ns
AR E 18/45	1 (0,68%)	1 (3,13%)	ns

* teste exato de Fisher para intervalo de confiança de 95%.

Observe que apenas a identificação de *M. hominis* esteve significativamente mais associada a capacidade de formação de biofilmes.

Na Tabela 4.6 é demonstrado a pesquisa de Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a o tipo de vaginose bacteriana (VB), onde é classificado como VB1 a vaginose sem bacilos curvos (escores 7 e 8), VB2 a com bacilos curvos (9 e 10).

Tabela 4.6. Pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase em tempo real conforme a o tipo de vaginose bacteriana (VB). VB1 sem bacilos curvos, VB2 com bacilos curvos.

	TIPO DE VB		
	VB 1 (n = 20)	VB2 (n = 8)	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	1 (12,5%)	ns
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	3 (15%)	4 (50%)	ns
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1 (5%)	-	ns
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
HPV			
16	-	-	-
18/45	-	1 (12,5%)	ns
AR	3 (15%)	-	ns
AR e 16	-	-	-
AR E 18/45	1 (5%)	-	ns

* teste exato de Fisher para intervalo de confiança de 95%.

Capítulo 5

Discussão

A microbiota vaginal é constituída por microrganismos que contribuem para o equilíbrio deste microambiente. Numa situação de normalidade a mulher deve apresentar uma predominância do gênero *Lactobacillus* na sua vagina, que produz ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, assim controlando a proliferação de patógenos na microbiota local. Em menor percentagem podem ser encontradas bactérias como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, dentre outras, assim como fungos do gênero *Candida* (Dominguez-Bello *et al.* 2016).

Neste estudo foi analisada a microbiota vaginal de 179 pacientes, com idade média de 36 anos, nas quais foram criados grupos utilizando o escore de Nugent, onde o escore com valor de 0 a 3 foi considerado microbiota normal, o escore com variação de 4 a 6 foi considerado como microbiota intermediária, e por último, valores de 7 a 10 sugeriam vaginose bacteriana (Bagnall and Rizzolo 2017). Entre os casos estudados 100 (55,86%) foram classificados como microbiota normal, enquanto 51 (28,5%) e 28 (15,64%) foram classificados como microbiota intermediária e vaginose bacteriana, respetivamente.

Como descrito por Alves e colaboradores (2016) a vaginose bacteriana (VB) é uma síndrome polimicrobiana que afeta as mulheres em que há uma diminuição de *Lactobacillus* e uma proliferação acentuada de outras bactérias, anaeróbias, como a *G. vaginalis* (Alves *et al.* 2016). Alterações na microbiota podem estar associadas com o aumento de infeções sexualmente transmissíveis (IST) incluindo a infeção pelo Papilomavírus humano (HPV) e pode também estar relacionado a persistência deste vírus (Paola *et al.* 2017).

As células escamosas imaturas em mulheres no menacme, não gestantes e sem uso de medicamentos hormonais, não apareceria normalmente em esfregaços cervico-vaginais. No entanto, tais, por conta de reação inflamatória, podem ser observadas em quadros de vaginite (Donders *et al.* 2002).

No presente estudo, podemos observar que ao contrário do que se imaginava, as células escamosas imaturas (parabasais) ocorreram mesmo em quadros de normalidade em 12% dos casos, e aproximadamente o mesmo valor nos quadros intermediários. No entanto, não foram observados em casos de vaginose bacteriana. Isto é muito importante, pois

este resultado, células parabasais tem sido observado nos casos definidos como vaginite aeróbia, mas como podemos observar, ocorre até mesmo em casos de normalidade (Donders *et al.* 2017; Eleutério Júnior *et al.* 2012). Ao mesmo tempo, este resultado, não constitui motivo de viés para o diagnóstico pelo escore de Nugent, da vaginose bacteriana (Eleutério Júnior *et al.* 2017).

Analisando a presença de células inflamatórias nos esfregaços, embora fosse de se esperar de que quadros de vaginose tivessem menos este resultado, não houve diferença estatística significativa. Já foi demonstrado que a não uniformidade do quadro de vaginose bacteriana é uma característica que não impõe a leucopenia como variável importante (Eleutério Júnior 2005).

Dentre os resultados do estudo da microbiota por Gram nos três grupos, foram bastante significativos a heterogeneidade da microbiota, e a maior quantidade de morfotipos por campo de imersão, onde a vaginose bacteriana teve uma microbiota de maior quantidade e mais heterogenia. Isto apenas confirma que a vaginose bacteriana é uma síndrome polimicrobiana, o que se reflete na heterogeneidade da microbiota e na sua maior população (Hardy *et al.* 2017).

Se tentarmos considerar que o resultado de grupos coesos e agregados de morfotipos bacterianos sugere a capacidade da formação de biofilme, observamos que esta capacidade existe nos três tipos de microbiota, mas, é significativamente maior na vaginose bacteriana (Priestley *et al.* 1997). No nosso estudo foi observado que nos casos de vaginose bacteriana em 67,86% dos casos havia identificação morfológica de biofilme. Campisciano e colaboradores (2018) avaliou 124 mulheres, sendo 60 delas saudáveis assintomáticas e 64 delas com sintomatologia, evidenciado que o aumento de heterogeneidade da vaginose bacteriana foi um fator fundamental, assim como a formação de biofilmes. A capacidade de formar biofilmes é uma forma das bactérias se defenderem (Campisciano *et al.* 2018). Esta capacidade já tem sido bastante demonstrada por outros estudos, mas, sua manifestação morfológica só tem sido observada em biopsia de vagina (Hardy *et al.* 2017).

Ainda quando se analisa o grupo de vaginose bacteriana foram observados 4 casos com concomitante identificação de morfotipo de *Candida* (14,3%). Chama a atenção a presença paradoxal de *Candida sp* em casos de vaginose bacteriana, inclusive de forma bastante significativa. Mas, este resultado já foi observado em outros estudos como referido por Eleutério Júnior e colaboradores (2012) (Eleutério Júnior *et al.* 2012). Importante ressaltar que a observação de *Candida sp* só ocorreu na vaginose bacteriana do tipo 1, que é a vaginose bacteriana sem a presença de bacilos curvos sugestivos de

Mobiluncus sp. Pramanick e colaboradores (2019) realizou um estudo relacionando a vaginose bacteriana com a presença de diversos agentes dentre eles a *Candida sp.* Os autores observaram que num terço das mulheres analisadas houve observação simultânea de vaginose bacteriana e *Candida sp.* (Pramanick *et al.* 2019).

A complexidade da microbiota vaginal e a heterogeneidade, não permitem fazer, até o momento conjecturas sobre a associação de vaginose bacteriana e leveduras, muito menos em relação a presença de *Mobiluncus sp.*

A identificação de morfotipo de *Mobiluncus* na microbiota vaginal é altamente específico, embora não seja sensível para o diagnóstico de vaginose bacteriana (Donders *et al.* 2017; Eleutério Júnior *et al.* 2012). Um estudo desenvolvido por Schwebke e Lawing (2001) concluiu que o *Mobiluncus* foi detectado por PCR em 84,5% das mulheres com vaginose bacteriana e em 38% das mulheres sem vaginose bacteriana (Schwebke and Lawing 2001). Por ser o PCR um teste altamente sensível não é surpresa o resultado de apenas 28,6% nos nossos casos, uma vez que fizemos a identificação de morfotipos em esfregaço corado pelo método de Gram. Por outro lado, Onderdonk e colaboradores (2016) observaram num estudo de revisão, onde os investigadores haviam utilizado microscopia até sequenciamento genético, que 40% a 60% das mulheres com vaginose bacteriana tinham *Mobiluncus* (Onderdonk, Delaney, and Fichorova 2016). Na opinião de Schwebke e Lawing (2001), mais importante do que a identificação de *Mobiluncus*, seria a especificação, uma vez que *M. curtisii* seria o mais observado, através de teste de PCR, associado a vaginose bacteriana (Schwebke and Lawing 2001).

Com relação a investigação de outros microrganismos que podem ser identificados por teste de PCR em tempo real, tais como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano não se observou diferença estatística significativamente entre os três grupos estudados, com exceção de *Mycoplasma hominis* mais observado nos casos de vaginose bacteriana. Mongelos e colaboradores (2015) realizaram um estudo em 189 mulheres comparando a microbiota de pacientes infetadas e não infetadas pelo HPV, assim como diagnosticadas com vaginose bacteriana e negativo para vaginose bacteriana, observando uma associação positiva entre os dois quadros (Mongelos *et al.* 2015). Embora nosso estudo tenha identificado HPV de alto risco em 29 (17%) casos estudados, não houve diferença significativa entre os três grupos. Talvez o pequeno número de casos e o desenho de corte transversal do estudo possam justificar a discrepância de nossos resultados com relação aos já observados por outros autores com relação a associação entre vaginose bacteriana e HPV (Kyrgiou, Mitra, and Moscicki 2017; Paola *et al.* 2017; Shannon *et al.* 2017).

Já *Chlamydia trachomatis* foi identificada em apenas um caso no grupo de vaginose bacteriana e não foi observado nos demais grupos. Isto justifica-se pelo pequeno número de casos identificados, provavelmente por devido à etária relativamente alta da população estudada, diferente da idade mais jovem em que se tem identificado mais frequentemente esta bactéria (Eleutério *et al.* 2007; Rodrigues *et al.* 2011).

A microbiota vaginal saudável é constituída de forma predominante por *Lactobacillus* que são responsáveis pelo controle microbiológico local (Kwasniewski *et al.* 2018; Priestley *et al.* 1997; Soper 1999). Na tabela 4.3, observamos que não houve diferença significativa na identificação de nenhum dos patógenos estudados. Embora HPV de sonda de alto risco esteja associado mais frequentemente a microbiota sugestiva de VB (7 a 10) (18,87%), comparado aos grupos intermediário (8,93%) e normal (7,1%), não foi observada significância para esta diferença. Estudos utilizando técnicas de pirosequenciamento têm observado uma significativa associação entre a disbiose vaginal com HPV e lesões induzidas. Devemos admitir as limitações do estudo morfológico do estudo por Gram utilizados por nós. No entanto, para o cotidiano este teste dá-nos uma ideia real, diferente de sequenciamento que não é realizado em serviços de assistência, mas, apenas em pesquisa.

Fernandes e colaboradores (2008) observaram o HPV de alto risco tem mais associação em casos de alta heterogeneidade de microbiota vaginal (Fernandes *et al.* 2008). Acredita-se que possa ocorrer devido o desenvolvimento de resposta imune adaptativa, que pode reverter o quadro infeccioso ou então manter o vírus em latência, que posteriormente pode passar por um processo de reativação podendo desencadear lesões no epitélio lesado (Soper 1999).

O desenvolvimento de IST pode está relacionado com a cronicidade de infecções polimicrobianas uma vez que a infecção persista pode levar a uma profunda mudança na microbiota vaginal, o que por sua vez pode fragilizar os mecanismos de defesa da microbiota contra agentes causadores de IST. A vaginose bacteriana sendo a mais frequente causa de instabilidade na microbiota vaginal, deve ser diagnostica e tratada de forma eficiente para se evitar a fragilidade da microbiota vaginal e assim ter maior suscetibilidade de contrair IST (Greer and Wendel Jr 2008; World Health Organization 2001).

As IST possuem elevada prevalência a nível global sendo relatado aproximadamente 1 milhão de novos casos por dia de infecções bacterianas curáveis.¹⁰¹ Tal fato é digno de alerta pois a elevada prevalência de infecções de fácil tratamento podem ser a porta de entrada para patógenos de elevado poder mutagénico e de baixo sucesso terapêutico.¹⁰⁰

Os principais agentes causadores de IST abordados em nosso trabalho tiveram os seus diagnósticos quase constantes frente às variáveis associadas à heterogeneidade, sendo sugestivo que os agentes em questão não possuem ação direta frente à heterogeneidade apresentada pela microbiota, sendo assim os devidos agentes podem apresentar resultados em qualquer parâmetro analisado seja ela de baixa, média ou elevada heterogeneidade. O estudo desenvolvido por Tamarelle e colaboradores (2018) referenciou o mesmo padrão evidenciado no nosso estudo, sendo importante evidenciar que o agente *C. Trachomatis* obteve um resultado discrepante do observado na literatura (Tamarelle *et al.* 2019). O resultado amplo apresentado por Tamarelle e evidenciada na literatura pode ser explicada devido à variação na faixa etária analisada. (Pinto *et al.* 2011)

Uma pesquisa desenvolvida por Lima e colaboradores (2018) evidenciou a possibilidade de coinfeção por agentes causadores de IST, sendo comprovada a possibilidade de infecção por dois ou mais agentes, tal resultado foi evidenciado no nosso estudo e é relatado amplamente na literatura (Ashshi *et al.* 2015; Lima *et al.* 2018). Testes moleculares de alta performance como o RT-PCR que foi utilizado pela nossa pesquisa representa a linha de frente como opção para diagnóstico e triagem de IST em países desenvolvidos (Verteramo *et al.* 2009). Os pontos positivos desta metodologia não estão relacionados apenas com a sua elevada sensibilidade e especificidade, mas também com a sua capacidade de identificação simultânea de diversos agentes num único teste. O nosso estudo analisou a presença dos agentes *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano. Foi relatado em pacientes sem sintomatologia descrita a presença de agentes causadores de IST sendo assim recomendado o rastreio preventivo assim como o tratamento imediato em caso de positividade para os agentes (Klebanoff and Coombs 1991).

Na tabela 4 procuramos associar o número de morfotipos bacterianos com os resultados de painel de IST e HPV de alto risco. Também não observamos associação significativa entre a quantidade maior de bactérias e as variáveis estudadas. A microbiota vaginal é importante contra agentes infecciosos, uma das alterações possíveis na microbiota vaginal é a vaginose bacteriana, que pode ser evidenciada em dois tipos distintos que seria ela a do tipo 1 e tipo 2. Diversos estudos comprovam a ação benéfica dos *Lactobacillus* na microbiota vaginal contra agentes de elevado potencial mutagénico como o HPV. A mucosa vaginal é colonizada por diversas bactérias comensais que formam um importante fator de proteção contra agentes patogénicos e desempenham papel central na manutenção da saúde (Guo *et al.* 2012; Rieth *et al.* 2018).

Algumas infecções por HPV podem persistir e progredir para o cancro cervical, sendo a vaginose bacteriana um fator de risco para aquisição de infecções persistentes por HPV. Diversos estudos trazem à luz uma possível relação entre a persistência pós tratamento da vaginose bacteriana e a infecção promovida pelo HPV, tal conclusão tem como base a elevação do pH vaginal durante o desenvolvimento e manutenção da colonização pela vaginose bacteriana (Costerton, Stewart, and Greenberg 1999; Leitich *et al.* 2003; Mania-Pramanik, Kerkar, and Salvi 2009; Verstraelen and Swidsinski 2013). A relação entre o HPV e a vaginose bacteriana também pode ser benéfica para a vaginose uma vez que o HPV possui a capacidade de degradar o muco cervical sendo este um fator facilitador que normalmente está associado a quadros de vaginose bacteriana, isolada e persistente como descrito por Guo e colaboradores (Guo *et al.* 2012).

Mulheres com vaginose bacteriana possuem uma microbiota pobre de *Lactobacillus* como foi evidenciado em nosso estudo, este fato faz com que ocorra um aumento abrupto de enzimas degradantes da mucosa como a sialidase que leva a alterações na barreira de mucosa, este mecanismo pode ser um fator positivo para a adesão e manutenção de agentes causadores de IST tal situação pode ser extremamente positiva para o HPV uma vez que tal mecanismo ajuda na adesão, invasão e incorporação do HPV ao genoma de células cervicais (Rieth *et al.* 2018).

O desenvolvimento da vaginose bacteriana sem o tratamento adequado pode ser extremamente lesivo a microbiota e ao hospedeiro, pois a persistência da vaginose bacteriana assim como a sua evolução na devida microbiota é um fator positivo para a formação de biofilmes microbianos, que são comunidades microbiológicas heterogêneas que conseguem se aderir a matriz tecidual e que podem apresentar uma acentuada resistência terapêutica e do sistema imunitário (Marsh and Bradshaw 1995; S. Oh *et al.* 2013).

Acredita-se que as interações célula a célula na microbiota vaginal possui papel fundamental no desenvolvimento de biofilmes e representa uma séria complicação ginecológica. Algumas espécies microbianas não possuem característica virulenta importante, sendo assim possuem um importante papel na composição estrutural do biofilme, foi demonstrado na literatura que os microrganismos não são organizados de forma aleatória em um biofilme, mas seguem de maneira orquestrada um padrão que culmina na adesão de toda a comunidade microbiológica. Foi proposto na literatura que o biofilme vaginal cria um ambiente favorável para bactérias anaeróbias, devido à presença de um gradiente de oxigênio no interior do biofilme (Brusselsaers *et al.* 2019; Gravett *et al.* 1986; Magaña-Contreras *et al.* 2015; Zariffard *et al.* 2002).

Consideramos que morfologicamente no esfregaço corado pelo método de Gram, um agregado bacteriano, poderia sugerir o biofilme. Assim podemos observar que este aspecto teve associação significativa com o resultado de *M. Hominis*, que foi observado em quase 16% dos casos com biofilme contra 1,36% dos casos sem biofilme. Os demais microagentes pesquisados não demonstraram diferença significativa. A capacidade de *M. hominis* se associara a formação de biofilme já foi demonstrado em casos de infecção do trato urinário, no entanto, ainda não tem sido estudado na vagina e colo uterino.

As vaginoses bacterianas são divididas em dois tipos, o primeiro deles é a vaginose bacteriana do tipo 1 que apresenta o escore de Nugent os valores de 7 e 8 e o segundo tipo é a vaginose bacteriana do tipo 2 que apresenta escore de Nugent valores de 9 e 10 e que possuem bacilos curvos que são indicativos de *Mobiluncus*. Neste estudo apenas um caso do tipo 2 obteve *Chlamydia trachomatis* identificada. O pequeno número não permite fazer qualquer discussão sobre relação entre as variáveis (Mitra *et al.* 2016).

Observa-se que o agente *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* e *Trichomonas vaginalis* não apresentam achados em ambos os tipos de vaginose bacteriana situação diferente do é observado no agente *Mycoplasma hominis* que obteve achados de 15% na vaginose bacteriana do tipo 1 e 50% na vaginose bacteriana do tipo 2. Todos os agentes citados não apresentam achados quando sobrepostos com vaginose bacteriana na literatura sendo sugerido aprofundar o estudo para entender de forma clara se existe ou não relação entre os agentes citados e a manutenção de vaginose bacteriana (Brusselaers *et al.* 2019).

Foi descrito uma baixa prevalência do HPV quando associado a presença de vaginose bacteriana. Avaliando o HPV 18/45 foi evidenciado apenas uma indicação de vaginose bacteriana sendo ela no tipo 2. Analisando o HPV de alto risco foi observado achados apenas na vaginose bacteriana do tipo 1. Foi evidenciado na literatura que a vaginose bacteriana antecedeu a persistência do HPV, implicando que o tratamento da vaginose bacteriana em mulheres assintomáticas com infecção por HPV de alto risco cervical possa ser justificado. A vaginose bacteriana é considerada como fator agravante para o desenvolvimento do HPV, sendo assim mulheres com vaginose bacteriana podem apresentar um maior risco de IST (Kero *et al.* 2017).

Capítulo 6

Conclusões

Foi demonstrado que no presente estudo, um aumento da microbiota cervical normal (55,86%), sendo seguido pela microbiota intermediária (28,5%), e com menos relatados a microbiota sugestiva de disbiose (15,64%).

O presente estudo não obteve resultados de células imaturas nos casos de vaginose bacteriana, obtendo um resultado quase idêntico nas macrobiotas normal e intermediária. No parâmetro de células inflamatórias foi evidenciado um resultado quase que constante entre as três macrobiotas analisadas, era esperado um resultado superior no quadro de vaginose o que não foi evidenciado. O parâmetro de citólise obteve como representante majoritário a microbiota normal com 10% dos resultados, sendo seguido por 1,96% da microbiota intermediária e surpreendentemente não sendo relatado em casos de vaginose bacteriana. Analisando o parâmetro de heterogeneidade pode ser observado que a vaginose bacteriana se apresenta em quadros de moderada e grande heterogeneidade, já os demais grupos obtêm resultados mais elevados em moderada heterogeneidade. Como esperado, a quantidade de microbiota é elevada em quadros de vaginose bacteriana. Seguindo o resultado observado no parâmetro de quantidade pode ser verificado que a formação de biofilme acontece de maneira mais marcante no parâmetro de vaginose bacteriana, obtendo resultado muito superior quando comparado com os demais parâmetros que obtiveram resultados próximos entre eles.

Foi observado que o parâmetro de vaginose bacteriana obteve resultados mais frequentes dos agentes *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano, sendo importante ressaltar que o maior resultado dentre os agentes foi descrito no HPV de alto risco, sendo evidenciado nos três parâmetros estudados, e sendo um resultado aproximado entre as macrobiotas. É importante enfatizar que a microbiota normal foi a mais acometida, sendo seguida pela vaginose bacteriana e por fim a microbiota intermediária.

O estudo pode evidenciar que os maiores resultados dos agentes *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*,

Ureaplasma urealyticum, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus humano ocorreram quando verificado uma moderada e alta heterogeneidade bacteriana, e ocorrendo resultado pontuais em baixa heterogeneidade bacteriana. É fundamental enfatizar que os únicos agentes evidenciados em todos os parâmetros foram o HPV de alto risco e o *Ureaplasma Urealyticum*.

Pode ser evidenciado que em linhas gerais quando se eleva a quantidade de morfotipos bacterianos ocorre maior achado dos agentes *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonas vaginalis* o que não pode ser evidenciado quando analisamos os agentes *Ureaplasma urealyticum* e Papilomavírus humano (16,18/45, AR e 16).

Os agentes *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* obtiveram maior resultado percentual quando analisado juntamente com o parâmetro biofilme, isto indica que estes agentes em especial o *Mycoplasma hominis* devem possuir relação para formação e manutenção do biofilme. Os achados relacionados ao HPV são diversos sendo assim não é possível conjecturar se o HPV possui ou não relação com a formação de biofilme. Importante frisar que o HPV de alto risco e o HPV AR e 18/45 elevaram suas percentagens quando analisado juntamente com a formação de biofilme.

Os achados no tocante a vaginose bacteriana ocorreram de maneira pulverizada entre os agentes, mas deve-se enfatizar que o agente *Mycoplasma hominis* foi evidenciado em 65% das pacientes que possuem vaginose bacteriana, sendo encontrado em 15% na vaginose bacteriana do tipo 1 e em 50% na vaginose do tipo 2 sendo assim possível conjecturar uma relação entre o agente em questão e a vaginose bacteriana.

Referências Bibliográficas

- Alves, Jose Antonio Barreto *et al.* 2016. “Pap Smears: Frequency of Gardnerella Vaginalis, Candida Spp., Trichomonas Vaginalis and Pill Use or Copper Intrauterine Device Use.” *Int Arch Med* 1: 1–6.
- Ashshi, Ahmed Mohamed *et al.* 2015. “Prevalence of 7 Sexually Transmitted Organisms by Multiplex Real-Time PCR in Fallopian Tube Specimens Collected From Saudi Women With and Without Ectopic Pregnancy.” *BMC Infect Dis* 15: 569.
- Audirac-Chalifour, Astride *et al.* 2016. “Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study.” *PLoS One* 11(4): e0153274.
- Aydin, Inci *et al.* 2014. “Large Scale RNAi Reveals the Requirement of Nuclear Envelope Breakdown for Nuclear Import of Human Papillomaviruses.” *PLoS Pathog* 10(5): e1004162.
- Bagnall, Paulette, and Denise Rizzolo. 2017. “Bacterial Vaginosis: A Practical Review.” *JAAPA* 30(12): 15–21.
- Bolton, Michael, Ariane van der Straten, and Craig R Cohen. 2008. “Probiotics: Potential to Prevent HIV and Sexually Transmitted Infections in Women.” *Sex Transm Dis* 35(3).
- Bordignon, Valentina *et al.* 2017. “How Human Papillomavirus Replication and Immune Evasion Strategies Take Advantage of the Host DNA Damage Repair Machinery.” *Viruses* 9(12): 390.
- Boris, S, and C Barbés. 2000. “Role Played by Lactobacilli in Controlling the Population of Vaginal Pathogens.” *Microbes Infect* 2(5): 543–46.
- Bray, Freddie *et al.* 2018. “Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.” *CA Cancer J Clin* 68(6): 394–424.
- Brotman, Rebecca M *et al.* 2018. “Association Between the Vaginal Microbiota, Menopause Status, and Signs of Vulvovaginal Atrophy.” *Menopause* 25(11): 1321–30.
- Bruni, Laia *et al.* 2010. “Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women With Normal Cytological Findings.” *J Infect Dis* 202(12): 1789–99.
- Brusselaers, Nele, Sadeep Shrestha, Janneke van de Wijgert, and Hans Verstraelen. 2019. “Vaginal Dysbiosis and the Risk of Human Papillomavirus and Cervical Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis.” *Am J Obstet Gynecol* 221(1): 9–18.e8.

- Burd, Eileen M, and Christina L Dean. 2016. "Human Papillomavirus." *Microbiol Spectr* 4(4): 177–95.
- Campisciano, Giuseppina *et al.* 2018. "Vaginal Microbiota Dysmicrobism and Role of Biofilm-Forming Bacteria." *Front Biosci (Elite Ed)* 10: 528–36.
- Carmichael, R., and B. L. Jeaffreson. 1939. "Basal Cells in the Epithelium of the Human Cervical Canal." *J Pathol Bacteriol* 49: 63–69.
- Carter, Jonathan R, Zongqun Ding, and Barbara R Rose. 2011. "HPV Infection and Cervical Disease: A Review." *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 51(2): 103–8.
- Cepheid. 2020. "The New GeneXpert® System." *New Systems. Same game-changing performance.*: 12. <https://p.widencdn.net/biaonv/Cepheid-GeneXpert-System-Brochure-CE-IVD-0309-English>.
- Cibas, Edmund, and Barbara Ducatman. 2009. *Cytology Diagnostic Principles and Clinical Correlates, Expert Consult*. 3rd ed. Saunders.
- Cibas, Edmund S, and Syed Z Al. 2009. "The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology." *Am J Clin Pathol* 132(5): 658–65.
- Costerton, J W, P S Stewart, and E P Greenberg. 1999. "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections." *Science* 284(5418): 1318–22.
- Cox, Georgina, and Gerard D Wright. 2013. "Intrinsic Antibiotic Resistance: Mechanisms, Origins, Challenges and Solutions." *Int J Med Microbiol* 303(6–7): 287–92.
- Cribby, Sarah, Michelle Taylor, and Gregor Reid. 2008. "Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics." *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008: 256490.
- Dethlefsen, Les, Margaret McFall-Ngai, and David A Relman. 2007. "An Ecological and Evolutionary Perspective on Human-Microbe Mutualism and Disease." *Nature* 449(7164): 811–18.
- Dominguez-Bello, Maria G *et al.* 2016. "Partial Restoration of the Microbiota of Cesarean-Born Infants via Vaginal Microbial Transfer." *Nat Med* 22(3): 250–53.
- Donders, Gilbert G G *et al.* 2002. "Definition of a Type of Abnormal Vaginal Flora That Is Distinct From Bacterial Vaginosis: Aerobic Vaginitis." *BJOG* 109(1): 34–43.
- Donders, Gilbert G G *et al.* 2017. "Aerobic Vaginitis: No Longer a Stranger." *Res Microbiol* 168(9–10): 845–58.
- Doorbar, John *et al.* 2012. "The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses." *Vaccine* 30(Suppl 5): F55–70.
- Dufour, Delphine, Vincent Leung, and Céline M. Lévesque. 2012. "Bacterial Biofilm: Structure, Function, and Antimicrobial Resistance." *Endodont Top* 22(1): 2–16.
- Egawa, Nagayasu, Kiyofumi Egawa, Heather Griffin, and John Doorbar. 2015. "Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia." *Viruses*

- 7(7): 3863–90.
- Eleutério Júnior, J *et al.* 2012. “Vaginite Inflamatória Descamativa e Vaginite Aeróbia.” *Rev Bras Patol Trat Genit Inf* 2(1): 178–81.
- Eleutério Júnior, José. 2005. “Vaginose Bacteriana. É a Falta de Infiltrado Inflamatório Vaginal Um Fator Importante?” *Rev Bras Anal Clin* 37(4): 219–21.
- Eleutério Júnior, J *et al.* 2017. “Inflammatory Cells in Liquid-Based Cytology Smears Classified as Bacterial Vaginosis.” *Diagn Cytopathol* 45(12): 1100–1104.
- Eleutério, RM, J Eleutério Júnior, PC Giraldo, and AMV Muniz. 2007. “Cervicite Por Chlamydia Trachomatis Em Mulheres Sexualmente Ativas Atendidas Em Um Serviço Privado de Ginecologia Na Cidade de Fortaleza.” *Rev Bras Anal Clin* 39: 287–90.
- Eloe-Fadrosch, Emiley A., and David A. Rasko. 2013. “The Human Microbiome: From Symbiosis to Pathogenesis.” *Annu Rev Med* 64: 146–63.
- Farage, Miranda, and Howard Maibach. 2006. “Lifetime Changes in the Vulva and Vagina.” *Arch Gynecol Obstet* 273(4): 195–202.
- Farage, Miranda, Kenneth Miller, and Jack Sobel. 2010. “Dynamics of the Vaginal Ecosystem-Hormonal Influences.” *Infect Dis Res Treat* 3: 1–15.
- Fernandes, Thales Allyrio Araújo de Medeiros *et al.* 2008. “Human Papillomavirus Infection in Women Attended at a Cervical Cancer Screening Service in Natal, Brazil.” *Braz J Microbiol* 39(3): 573–78.
- Ferreira, Ana Rita, Ana Catarina Ramalho, Mariana Marques, and Daniela Ribeiro. 2020. “The Interplay between Antiviral Signalling and Carcinogenesis in Human Papillomavirus Infections.” *Cancers* 12(3): 646.
- Friedman, Lisa, and Roberto Kolter. 2004. “Genes Involved in Matrix Formation in Pseudomonas Aeruginosa PA14 Biofilms.” *Mol Microbiol* 51(3): 675–90.
- Gardner, H L, and C D Dukes. 1955. “Haemophilus Vaginalis Vaginitis: A Newly Defined Specific Infection Previously Classified ‘Nonspecific’ Vaginitis.” *Am J Obstet Gynecol* 69(5): 962–76.
- Giannaki, Maria *et al.* 2013. “Human Papillomavirus (HPV) Genotyping of Cutaneous Warts in Greek Children.” *Pediatr Dermatol* 30(6): 730–35.
- Graham, Sheila V. 2017. “The Human Papillomavirus Replication Cycle, and Its Links to Cancer Progression: A Comprehensive Review.” *Clin Sci (Lond)* 131(17): 2201–21.
- Graham, Sheila V, and Arwa Ali A Faizo. 2017. “Control of Human Papillomavirus Gene Expression by Alternative Splicing.” *Virus Res* 231: 83–95.
- Gravett, M G *et al.* 1986. “Independent Associations of Bacterial Vaginosis and Chlamydia Trachomatis Infection With Adverse Pregnancy Outcome.” *JAMA* 256(14): 1899–1903.

- Greenwood, J. R., and M. J. Pickett. 1980. "Transfer of *Haemophilus Vaginalis* Gardner and Dukes to a New Genus, *Gardnerella*: *G. Vaginalis* (Gardner and Dukes) Comb. Nov." *Int J Syst Evol Microbiol* 30(1): 170–78.
- Greer, Laura, and George D Wendel Jr. 2008. "Rapid Diagnostic Methods in Sexually Transmitted Infections." *Infect Dis Clin North Am* 22(4): 601–17.
- Groves, Ian J, and Nicholas Coleman. 2015. "Pathogenesis of Human Papillomavirus-Associated Mucosal Disease." *J Pathol* 235(4): 527–38.
- Guo, Y-L *et al.* 2012. "Bacterial Vaginosis Is Conducive to the Persistence of HPV Infection." *Int J STD AIDS* 23(8): 581–84.
- Gupta, S, and P Sodhani. 2000. "Nuclear Grooves in Intermediate Cells in Cervical Smears." *Cytophatology* 11(2): 91–95.
- Harden, Mallory E, and Karl Munger. 2017. "Human Papillomavirus Molecular Biology." *Mutat Res Rev Mutat Res* 772: 3–12.
- Hardy, Liselotte *et al.* 2017. "Bacterial Biofilms in the Vagina." *Res Microbiol* 168(9–10): 865–74.
- Heiden, Matthew G Vander, Lewis C Cantley, and Craig B Thompson. 2009. "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation." *Science* 324(5930): 1029–33.
- Herfs, Michael *et al.* 2012. "A Discrete Population of Squamocolumnar Junction Cells Implicated in the Pathogenesis of Cervical Cancer." *PNAS* 109(26): 10516–21.
- Hess, Matthias *et al.* 2011. "Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen." *Science* 331(6016): 463–67.
- Hovelius, B, and P A Mårdh. 1984. "Staphylococcus Saprophyticus as a Common Cause of Urinary Tract Infections." *Rev Infect Dis* 6(3): 328–37.
- Jirovec, O, R Peter, and I Malek. 1948. "Neue Klassifikation Der Vaginalbiocoenose Auf Sechs Grundbilder." *Gynecol Obstet Invest* 126(77): 99.
- Kadaja, Meelis, Toomas Silla, Ene Ustav, and Mart Ustav. 2009. "Papillomavirus DNA Replication - From Initiation to Genomic Instability." *Virology* 384(2): 360–68.
- Karim, Rezaul *et al.* 2013. "Human Papillomavirus (HPV) Upregulates the Cellular Deubiquitinase UCHL1 to Suppress the Keratinocyte's Innate Immune Response." *PLoS Pathog* 9(5): e1003384.
- Kero, K *et al.* 2017. "Association of Asymptomatic Bacterial Vaginosis With Persistence of Female Genital Human Papillomavirus Infection." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36(11): 2215–19.
- Klebanoff, S J, and R W Coombs. 1991. "Viricidal Effect of *Lactobacillus Acidophilus* on Human Immunodeficiency Virus Type 1: Possible Role in Heterosexual Transmission." *J Exp Med* 174(1): 289–92.

- Koss, Leopold G. 2006. *Introdução à Citopatologia Ginecológica Com Correlações Histológicas e Clínicas*. 1st ed. eds. Leopold G. Koss and Claude Gompel. São Paulo, Brasil: Roca.
- Kwasniewski, Wojciech *et al.* 2018. “Microbiota Dysbiosis Is Associated With HPV-Induced Cervical Carcinogenesis.” *Oncol Lett* 16(6): 7035–47.
- Kyrgiou, Maria, Anita Mitra, and Anna-Barbara Moscicki. 2017. “Does the Vaginal Microbiota Play a Role in the Development of Cervical Cancer?” *Transl Res* 179: 168–82.
- Łaniewski, Paweł *et al.* 2018. “Linking Cervicovaginal Immune Signatures, HPV and Microbiota Composition in Cervical Carcinogenesis in Non-Hispanic and Hispanic Women.” *Sci Rep* 8(1): 7593.
- Lederberg, J, and AT McCray. 2001. “Ome Sweet 'Omics - A Genealogical Treasury of Words.” *Scientist* 15(7): 8.
- Leitich, Harald *et al.* 2003. “Bacterial Vaginosis as a Risk Factor for Preterm Delivery: A Meta-Analysis.” *Am J Obstet Gynecol* 189(1): 139–47.
- Leroy, Jean-Louis, and Françoise Boman. 2003. “Cervical Smears: Towards an Optimal Screening for Cervical Cancer.” *Presse Med* 32(4): 174–80.
- Lewis, K. 2008. “Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells.” *Curr Top Microbiol Immunol* 322: 107–31.
- Lima, Luiza de Miranda *et al.* 2018. “Sexually Transmitted Infections Detected by Multiplex Real Time PCR in Asymptomatic Women and Association With Cervical Intraepithelial Neoplasia.” *Rev Bras Ginecol Obstet* 40(9): 540–46.
- Litwin, Tamara R, Megan A Clarke, Michael Dean, and Nicolas Wentzensen. 2017. “Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis.” *Viruses* 9(8): 206.
- Ma, Bing, Larry J Forney, and Jacques Ravel. 2012. “The Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Diseases.” *Annu Rev Microbiol* 66: 371–89.
- Magaña-Contreras, Mariana *et al.* 2015. “Prevalence of Sexually Transmitted Pathogens Associated With HPV Infection in Cervical Samples in a Mexican Population.” *J Med Virol* 87(12): 2098–2105.
- Mania-Pramanik, J, S C Kerkar, and V S Salvi. 2009. “Bacterial Vaginosis: A Cause of Infertility?” *Int J STD AIDS* 20(11): 778–81.
- Marsh, P D, and D J Bradshaw. 1995. “Dental Plaque as a Biofilm.” *J Ind Microbiol* 15(3): 169–75.
- Martin, H L *et al.* 1999. “Vaginal Lactobacilli, Microbial Flora, and Risk of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Sexually Transmitted Disease Acquisition.” *J Infect Dis* 180(6): 1863–68.

- McBride, Alison A. 2008. "Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes." *Adv Virus Res* 72: 155–205.
- McLaughlin-Drubin, Margaret E, and Karl Münger. 2009. "Oncogenic Activities of Human Papillomaviruses." *Virus Res* 143(2): 195–208.
- Mendling, Werner. 2016. "Vaginal Microbiota." In *Microbiota of the Human Body. Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol 902*, ed. A Schwiertz. , 83–93.
- Mitra, A *et al.* 2015. "Cervical Intraepithelial Neoplasia Disease Progression Is Associated With Increased Vaginal Microbiome Diversity." *Sci Rep* 5: 16865.
- Mitra, Anita *et al.* 2016. "The Vaginal Microbiota, Human Papillomavirus Infection and Cervical Intraepithelial Neoplasia: What Do We Know and Where Are We Going Next?" *Microbiome* 4: 58.
- Moerman-Herzog, Andrea, and Mayumi Nakagawa. 2015. "Early Defensive Mechanisms Against Human Papillomavirus Infection." *Clin Vaccine Immunol* 22(8): 850–57.
- Mongelos, Pamela *et al.* 2015. "Distribution of Human Papillomavirus (HPV) Genotypes and Bacterial Vaginosis Presence in Cervical Samples From Paraguayan Indigenous." *Int J Infect Dis* 39: 44–49.
- Murray, Patrick R, and Ellen Jo Baron. 2003. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. eds. Patrick R. Murray *et al.* Washington, D.C: American Society for Microbiology Press.
- Nandakumar, Venkatesan, Samuel Chittaranjan, Valikapathalil Mathew Kurian, and Mukesh Doble. 2012. "Characteristics of Bacterial Biofilm Associated with Implant Material in Clinical Practice." *Polymer Journal* 45: 137–52.
- Oh, H Y, M K Kim, S Seo, D O Lee, *et al.* 2015. "Alcohol Consumption and Persistent Infection of High-Risk Human Papillomavirus." *Epidemiol Infect* 143(7): 1442–50.
- Oh, H Y, B-S Kim, S-S Seo, J-S Kong, *et al.* 2015. "The Association of Uterine Cervical Microbiota With an Increased Risk for Cervical Intraepithelial Neoplasia in Korea." *Clin Microbiol Infect* 21(7): 674.e1-9.
- Oh, Sangnam *et al.* 2013. "Possible Involvement of Mycoplasma Hominis in Inhibiting the Formation of Biofilms by Uropathogenic Escherichia Coli (UPEC)." *Biosci Biotechnol Biochem* 77(10): 2025–29.
- Onderdonk, Andrew B, Mary L Delaney, and Raina N Fichorova. 2016. "The Human Microbiome During Bacterial Vaginosis." *Clin Microbiol Rev* 29(2): 223–38.
- Osset, J, R M Bartolomé, E García, and A Andreu. 2001. "Assessment of the Capacity of Lactobacillus to Inhibit the Growth of Uropathogens and Block Their Adhesion to Vaginal Epithelial Cells." *J Infect Dis* 183(3): 485–91.

- Paola, Monica Di *et al.* 2017. “Characterization of Cervico-Vaginal Microbiota in Women Developing Persistent High-Risk Human Papillomavirus Infection.” *Sci Rep* 7(1): 10200.
- Parfenov, Michael *et al.* 2014. “Characterization of HPV and Host Genome Interactions in Primary Head and Neck Cancers.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(43): 15544–49.
- Payandeh, Fariba, and Leopold G Koss. 2003. “Nuclear Grooves in Normal and Abnormal Cervical Smears.” *Acta Cytol* 47(3): 421–25.
- Peterson, Elizabeth, and Parjit Kaur. 2018. “Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens.” *Front Microbiol* 9: 2928.
- Pinto, Valdir Monteiro *et al.* 2011. “Chlamydia Trachomatis Prevalence and Risk Behaviors in Parturient Women Aged 15 to 24 in Brazil.” *Sex Transm Dis* 38(10): 957–61.
- Pires, Cláudia Lopes. 2009. Lesões intraepiteliais escamosas do colo uterino (LSIL/HSIL) *Lesões Intraepiteliais Escamosas Do Colo Uterino (LSIL/HSIL)*.
- Piyathilake, Chandrika J *et al.* 2016. “Cervical Microbiota Associated With Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected With High-Risk Human Papillomaviruses.” *Cancer Prev Res (Phila)* 9(5): 357–66.
- Pramanick, Rinku *et al.* 2019. “Vaginal Microbiota of Asymptomatic Bacterial Vaginosis and Vulvovaginal Candidiasis: Are They Different From Normal Microbiota?” *Microb Pathog* 134: 103599.
- Priestley, C J, B M Jones, J Dhar, and L Goodwin. 1997. “What Is Normal Vaginal Flora?” *Genitourin Med* 73(1): 23–28.
- Pyeon, Dohun *et al.* 2009. “Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression.” *PLoS Pathog* 5(2): e1000318.
- Ravel, Jacques *et al.* 2011. “Vaginal Microbiome of Reproductive-Age Women.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(Suppl 1): 4680–87.
- Reid, Gregor, and Alan Bocking. 2003. “The Potential for Probiotics to Prevent Bacterial Vaginosis and Preterm Labor.” *Am J Obstet Gynecol* 189(4): 1202–8.
- Richards, Rebecca M, Douglas R Lowy, John T Schiller, and Patricia M Day. 2006. “Cleavage of the Papillomavirus Minor Capsid Protein, L2, at a Furin Consensus Site Is Necessary for Infection.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5): 1522–27.
- Rickard, Alexander H *et al.* 2003. “Bacterial Coaggregation: An Integral Process in the Development of Multi-Species Biofilms.” *Trends Microbiol* 11(2): 94–100.
- Rieth, Katherine K S *et al.* 2018. “Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus in Tonsil Tissue in Healthy Adults and Colocalization in Biofilm of Tonsillar Crypts.” *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 144(4): 231–37.

- Rodrigues, M M *et al.* 2011. “Frequency of Chlamydia Trachomatis, Neisseria Gonorrhoeae, Mycoplasma Genitalium, Mycoplasma Hominis and Ureaplasma Species in Cervical Samples.” *J Obstet Gynaecol* 31(3): 237–41.
- Rositch, Anne F *et al.* 2013. “Patterns of Persistent Genital Human Papillomavirus Infection Among Women Worldwide: A Literature Review and Meta-Analysis.” *Int J Cancer* 133(6): 1271–85.
- Schiffman, Mark *et al.* 2007. “Human Papillomavirus and Cervical Cancer.” *Lancet* 370(9590): 890–907.
- Schröder, R. 1921. “Zur Pathogenese Und Klinik Des Vaginalen Fluors.” *Zentralbl Gynäkol* 38: 1350–61.
- Schwebke, J R, and L F Lawing. 2001. “Prevalence of Mobiluncus SPP Among Women With and Without Bacterial Vaginosis as Detected by Polymerase Chain Reaction.” *Sex Transm Dis* 28(4): 195–99.
- Seegene Brazil. 2019. “Allplex™ STI Essentials Assay.” <https://seegenebrazil.com.br/allplex-sti-essential/>.
- Shanmugasundaram, Srinidhi, and Jianxin You. 2017. “Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection.” *Viruses* 9(8): 229.
- Shannon, B *et al.* 2017. “Association of HPV Infection and Clearance With Cervicovaginal Immunology and the Vaginal Microbiota.” *Mucosal Immunol* 10(5): 1310–19.
- Solomon, Diane *et al.* 2002. “The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology.” *JAMA* 287(16): 2114–19.
- Solomon, Diane, and Ritu Nayar. 2004. *Sistema Bethesda Para Relato de Citologia Cervical: Definições, Critérios e Notas Explicativas Sistema Bethesda Para Relato de Citologia Cervical: Definições, Critérios e Notas Explicativas*. 2nd ed. eds. Ritu Nayar and David Wilbur. Thieme Revinter.
- Soper, DE. 1999. “Gynecologic Complications of Bacterial Vaginosis: Fact or Fiction?” *Curr Infect Dis Rep* 1(4): 393–97.
- Srinivasan, Sujatha *et al.* 2015. “Metabolic Signatures of Bacterial Vaginosis.” *mBio* 6(2): e00204-15.
- Stewart, P S, and J W Costerton. 2001. “Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms.” *Lancet* 358(9276): 135–38.
- Tamarelle, J *et al.* 2019. “The Vaginal Microbiota and Its Association With Human Papillomavirus, Chlamydia Trachomatis, Neisseria Gonorrhoeae and Mycoplasma Genitalium Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Clin Microbiol Infect* 25(1): 35–47.

- Thomas, K K *et al.* 2000. "Concurrent and Sequential Acquisition of Different Genital Human Papillomavirus Types." *J Infect Dis* 182(4): 1097–1102.
- Thomas, Stanley. 1928. "Döderlein's Bacillus: *Lactobacillus Acidophilus*." *J Infect Dis* 43(3): 218–27.
- Verstraelen, Hans, and Alexander Swidsinski. 2013. "The Biofilm in Bacterial Vaginosis: Implications for Epidemiology, Diagnosis and Treatment." *Curr Opin Infect Dis* 26(1): 86–89.
- Verteramo, Rosita *et al.* 2009. "Human Papillomaviruses and Genital Co-Infections in Gynaecological Outpatients." *BMC Infect Dis* 9: 16.
- Vooijs, G. Peter, J. Bulten, and A.J.M. van Aspert-van Erp. 2008. "Benign Proliferative Reactions, Intraepithelial Neoplasia, and Invasive Cancer of the Uterine Cervix." In *Comprehensive Cytopathology*, Philadelphia, United States: Saunders, 131–212.
- Wank, R, and C Thomssen. 1991. "High Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Cervix for Women With HLA-DQw3." *Nature* 352(6337): 723–25.
- Whitchurch, Cynthia B, Tim Tolker-Nielsen, Paula C Ragas, and John S Mattick. 2002. "Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation." *Science* 295(5559): 1487.
- van De Wijgert, J H *et al.* 2000. "Intravaginal Practices, Vaginal Flora Disturbances, and Acquisition of Sexually Transmitted Diseases in Zimbabwean Women." *J Infect Dis* 181(2): 587–94.
- World Health Organization. 2001. *Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: Overview and Estimates*. Geneva, Switzerland.
- Wright, Thomas C, Robert J Kurman, and Alex Ferenczy. 2002. "Precancerous Lesions of the Cervix." In *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, ed. Robert J Kurman. New York, United States, 229–77.
- Yildirim, Suleyman *et al.* 2014. "Primate Vaginal Microbiomes Exhibit Species Specificity without Universal *Lactobacillus* Dominance." *ISME J* 8(12): 2431–44.
- Zariffard, M Reza, Mohammed Saifuddin, Beverly E Sha, and Gregory T Spear. 2002. "Detection of Bacterial Vaginosis-Related Organisms by Real-Time PCR for *Lactobacilli*, *Gardnerella Vaginalis* and *Mycoplasma Hominis*." *FEMS Immunol Med Microbiol* 34(4): 277–81.
- Zhang, Lei *et al.* 2015. "Variants of Human Papillomavirus Type 16 Predispose Toward Persistent Infection." *Int J Clin Exp Pathol* 8(7): 8453–59.
- Zheng, H Y, T M Alcorn, and M S Cohen. 1994. "Effects of H₂O₂-Producing *Lactobacilli* on *Neisseria Gonorrhoeae* Growth and Catalase Activity." *J Infect Dis* 170(5): 1209–15.

Zhou, JZ, SS Way, and K Chen. 2018. "Immunology of Uterine and Vaginal Mucosae."
Trends Immunol 39(4): 355.