



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHÃES

**ESTUDO DA MICROBIOTA VAGINAL POR GRAM, pH, E NÍVEIS DE LACTATO
VAGINAIS EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E CÂNCER DE COLO
UTERINO**

FORTALEZA - CEARÁ

2020

CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHÃES

Estudo da Microbiota Vaginal por Gram, Ph, e Níveis de Lactato Vaginais em Lesões
Intraepiteliais Cervicais e Câncer de Colo Uterino

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Patologia da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará para obtenção do grau
de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eleutério Júnior

FORTALEZA – CEARÁ

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C818e Cordeiro Benevides de Magalhães, Christina.
Estudo da Microbiota Vaginal por Gram, Ph, e Níveis de Lactato Vaginais em Lesões Intraepiteliais Cervicais e Câncer de Colo Uterino : José / Christina Cordeiro Benevides de Magalhães. – 2020.
70 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Eleutério Júnior.
1. Papilomavírus Humano. 2. Câncer de colo uterino. 3. Microbioma vaginal. 4. Lesões intraepiteliais. 5. D-lactato. I. Título.

CDD 615.1

CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHÃES

ESTUDO DA MICROBIOTA VAGINAL POR GRAM, pH, E NÍVEIS DE LACTATO
VAGINAIS EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E CÂNCER DE COLO
UTERINO

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Patologia da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará para obtenção do grau
de Mestre em Patologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Eleutério Junior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Iara Moreno Linhares
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dra. Cristiane Cunha Frota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Renata Mirian Nunes Eleutério
Centro Universitário Christus

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vocação para a medicina e por sempre me orientar no melhor caminho a seguir.

Às pacientes que acompanho no Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará, pela disponibilidade e contribuição com nosso trabalho.

Ao meu orientador, professor Eleutério, por compartilhar seus conhecimentos, pela paciência, presteza nas orientações e por disponibilizar a estrutura do laboratório Prof. Eleutério da Costa para a viabilidade desta tese. Para mim é uma honra tê-lo como orientador.

À minha co-orientadora Renata Eleutério, por sua amorosidade e por ter abraçado meu projeto. Seu trabalho foi de fundamental importância para a conclusão dessa dissertação. A você meu muito obrigada e o desejo de poder retribuir seu apoio um dia.

Ao meu marido Paulo César que me acompanhou na escola, faculdade, residência médica e agora mestrado, por todo o apoio e por ter preenchido os espaços da minha ausência em nossa família. A você todo meu amor e admiração.

Às minhas filhas, Ana Beatriz, Ana Paula e Ana Christina, peço desculpas e agradeço por compreenderem meus momentos de ausência. Obrigada por terem me proporcionado tranquilidade nessa trajetória. Vocês são filhas realmente especiais.

Às amigas Larice e Mana, um agradecimento especial pela preciosa ajuda e atenção com as crianças nesses 2 anos.

Aos meus pais, que sempre primaram pela minha educação e me mostraram a importância do trabalho.

Ao Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará e seus funcionários, pela imprescindível colaboração na coleta do material. É um prazer poder trabalhar com vocês.

Aos funcionários do Laboratório Professor Eleutério, pela receptividade, boa vontade em ajudar e pela colaboração com essa pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta dissertação, os meus mais sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	HPV	18
Figura 2	Estrutura do HPV	19
Figura 3	HPV-Organização circular e integração ao DNA do hospedeiro	19
Figura 4	HPV-evolução	23
Figura 5	Mudanças de microbioma durante o desenvolvimento de imunossupressão	25
Figura 6	Efeito eubiótico do estrogênio e Lactobacilos sobre o meio vaginal..	28
Figura 7	Transição da microbiota vaginal	30
Figura 8	O microambiente vaginal durante estados alternativos de eubiose e VB	31
Figura 9	Score de Nugent	32
Figura 10	Resumo dos principais mecanismos associando vaginose bacteriana à doença cervical	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas e demográficas dos pacientes	48
Tabela 2	Concentrações de L-lactato e D-lactato	49

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1	L-lactato x diagnósticos	49
------------------	--------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCI	Câncer Cervical Invasor
CCU	Câncer de Colo Uterino
CDH1	Cadherin-1
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	High Grade Intraepitelial Lesion
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LSIL	Low Grade Intraepitelial Lesion
LT CITOTÓXICOS	Linfócitos t Citotóxicos
TAP1	Transporter associated with antigen processing
TLR-9	Toll Like Receptor 9

RESUMO

Introdução: O câncer de colo uterino é uma patologia de alta prevalência na população do estado do Ceará. Esse agravo apresenta estreita correlação com a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) que é considerado causa necessária para o desenvolvimento dessa doença. As lesões intraepiteliais de baixo e de alto grau são a consequência do efeito citopático do Papilomavírus humano no tecido epitelial do colo uterino sendo que as lesões de alto grau (HSILs) são consideradas precursoras do câncer de colo uterino. Um microbioma vaginal balanceado é importante para a manutenção da saúde do trato genital feminino e prevenção de infecções vulvo-vaginais. Têm-se demonstrado que mulheres infectadas por HPV apresentam redução dos lactobacilos e maior diversidade da microbiota vaginal. Comunidades microbianas locais podem influenciar a aquisição e persistência do HPV e subsequente desenvolvimento de câncer. Os lactobacilos acidificam a vagina através da produção e manutenção da concentração vaginal de ácido láctico de 1% com uma mistura aproximadamente racêmica de isômeros D e L. O ácido láctico é uma das principais substâncias presentes na cavidade vaginal sendo atribuída à sua presença, a manutenção do pH vaginal em níveis entre 3,5 e 4,5, considerado o valor ideal para a manutenção da saúde genital feminina. Os lactobacilos produzem ácido láctico em sua forma levógira (AcL-L) e/ou dextrógira (AcL-D) e a célula epitelial vaginal também produz ácido láctico, mas apenas em sua forma isomérica levógira (AcL-L) e em pequenas concentrações. Os isômeros do ácido láctico possuem, cada um, propriedades específicas na homeostase vaginal. O AcL-D tem maior atividade protetora contra a disbiose vaginal. O AcL-L apresenta propriedades imunes como estímulo de IL-23/IL-17, indução de citocinas pro-inflamatórias pelas células epiteliais na presença de RNA viral sintético, indução da angiogênese tumoral e inibição do crescimento bacteriano. Em virtude da elevada prevalência da infecção pelo HPV, do elevado número de casos de câncer de colo uterino e de seu importante impacto na qualidade de vida da população feminina brasileira torna-se de fundamental importância a pesquisa nessa área de conhecimento.

Objetivo: Avaliar a microbiota vaginal, por bacterioscopia por Gram utilizando score de Nugent, medir pH e dosar D-lactato e L-lactato em conteúdo vaginal de mulheres com diagnóstico de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e câncer escamoso de colo uterino (CEC) e de pacientes sem lesões.

Métodos: Estudo observacional, transversal, quantitativo e comparativo realizado no Instituto de prevenção do Câncer do Ceará no período de fevereiro/2019 a outubro/2019 abrangendo mulheres selecionadas aleatoriamente com idade entre 18 e 69 anos quando se coletou 80 amostras de conteúdo vaginal distribuídas entre os diagnósticos de LSIL/HSIL/CEC e controles. Antes da colposcopia, confeccionamos lâminas com esfregaços de conteúdo vaginal que foram coradas pela técnica de Gram para leitura observando os critérios de Nugent, medimos pH em parede vaginal lateral direita através de fita indicadora posicionada em contato direto com a mucosa vaginal e colhemos conteúdo vaginal para diluição em tubo plástico contendo 1 ml de PBS. O material foi posteriormente processado para dosagem de D e L-lactato. A análise estatística foi realizada mediante a utilização do programa estatístico GraphPad Prism® e SPSS®. O nível de significância estatística considerado para todas as análises foi $p < 0.05$.

Resultados: A amostra representada por 80 pacientes foi dividida entre os seguintes grupos de acordo com os diagnósticos: mulheres sem lesões intraepiteliais ou negativo (23/

28,75%), LSIL (10/ 12,5%), HSIL (45/ 56,25%), CEC (2/ 2,5%). A média de idade do grupo negativo foi de 46,04 anos, no grupo LSIL foi de 41,7 anos, no grupo HSIL foi de 37,95 anos e no grupo CEC foi de 52,5 anos. Quando correlacionamos os morfotipos de microbiota vaginal e os diagnósticos analisados não observamos resultados estatísticos significantes. Ao avaliarmos a média de pH e os valores de D-lactato os resultados também não foram significantes. Contudo, foi possível demonstrar com valores significativos ($p < 0,0001$) que as mulheres com diagnóstico de HSIL em conjunto com o diagnóstico de câncer apresentam uma maior quantidade de L-lactato no fluido vaginal quando comparado com o grupo controle. **Conclusões:** Esta constatação nos leva a crer em um importante papel do L-lactato no processo de carcinogênese cervical, necessitando de mais estudos para melhor avaliação.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano. Câncer de colo uterino. Microbioma vaginal. Lesões intraepiteliais. D-lactato. L-lactato.

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is a highly prevalent disease in the Ceara state's population. Cervical cancer is closely correlated with the human papillomavirus (HPV) infection, which is considered the primary cause for the development of this type of cancer. Low- and high-grade squamous intraepithelial lesions are consequence of the cytopathic effect of human papillomavirus on the epithelial tissue of the uterine cervix. High-grade squamous intraepithelial lesions (HSILs) are considered to be precursors of cervical cancer. A balanced vaginal microbiome is important for maintaining the female genital tract health and for preventing vulvovaginal infections. Research has shown that HPV-infected women tend to have reduced lactobacilli and greater vaginal microbiota diversity. Local microbial communities can influence the acquisition and persistence of HPV infection, and the subsequent development of cancer. Lactobacilli acidify the vagina through the production of 1% lactic acid in a nearly racemic mixture of D and L isomers. Lactic acid is one of the main substances in the vaginal cavity, and it is responsible for maintaining the pH levels between 3.5 and 4.5. These pH levels are considered ideal for keeping female genital health. Lactobacilli produce lactic acid in its levogyre (L) and / or dextrogyre (D) form, while vaginal epithelial cell only produces lactic acid in the levogyre isomeric form (AcL-L), and in small concentrations. Each lactic acid isomer has specific properties in vaginal homeostasis. D-lactate has a greater protective activity against vaginal dysbiosis. L-lactate has immune properties such as stimulation of IL-23 / IL-17, induction of pro-inflammatory cytokines in epithelial cells when synthetic viral RNA is present, tumor angiogenesis induction, and bacterial growth inhibition. The great number of HPV infection and cervical cancer, and the impact of these diseases in the Brazilian female population reinforce the need and importance of research in this study area. **Objective:** To evaluate the microbiota vaginal, using Gram bacterioscopy and Nugent score, and to measure pH, D-lactate, and L-lactate in vaginal content of health women (no lesions), and of women diagnosed with LSIL, HSIL, cervical cancer. **Methods:** This observational, cross-sectional, quantitative and comparative study was conducted at the Ceara Cancer Prevention Institute during the period from February 2019 to October 2019. The randomly selected sample was composed of the vaginal content of 80 women with ages between 18 and 69 years old, with different diagnosis, including control, LSIL, HSIL, and cervical cancer. Before colposcopy, we made slides with vaginal content smears that were stained by the Gram technique for reading observing the Nugent criteria. We have also measured pH on the right lateral vaginal wall using an indicator tape positioned in direct contact with the vaginal mucosa. In addition, we collected vaginal content for dilution in a plastic tube containing 1 ml of PBS. The material was subsequently processed to measure D and L-lactates. **Statistical analysis:** Statistical analysis used the software GraphPad Prism® and SPSS®. The level of statistical significance considered for all analyzes was p-value <0.05. **Results:** The 80 patient sample was stratified into the following diagnostic groups: women without intraepithelial lesions or negative (23/ 28.75%), LSIL (10/ 12.5%), HSIL (45/ 56, 25%), CEC (2/ 2.5%). The mean age of the negative group was 46.04 years old, of the LSIL group was 41.7 years old, of the HSIL group was 37.95 years old, and of the CEC group it was 52.5 years old. There were no observed statistically significant results when correlating the studied diagnosis with the vaginal microbiota morphotypes, with the mean pH, and with the D-lactate. However, it was possible to demonstrate with statistically significant results (p-value <0.0001) that women

diagnosed with HSIL plus cancer diagnosis have a higher amount of L-lactate in the vaginal fluid when compared to the control group. **Conclusions:** This finding indicates that the L-lactate plays an important role in the process of cervical carcinogenesis, requiring further investigation for better characterization and analysis.

Keywords: Human Papillomavirus. Cervical cancer. Vaginal microbiome. Intraepithelial lesions. D-lactate. L-lactate.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Câncer de Colo Uterino	14
1.1.1	Histórico da Prevenção do Câncer de Colo	15
1.2	Papilomavírus humano- Vírus HPV	17
1.3	Lesões Intraepiteliais de Baixo e de Alto Grau ou “ <i>Low and High Grade Intraepithelial Lesions</i> ” (LSIL/HSIL) e Câncer Cervical	23
1.4	Microbioma Vaginal	24
1.4.1	Lactobacilos E Acido Láctico	26
1.4.2	Vaginose Bacteriana	30
2	JUSTIFICATIVA	35
3	PERGUNTA DE PARTIDA	36
4	HIPÓTESE	37
5	OBJETIVOS	38
5.1	Objetivo Geral	38
5.2	Objetivos Específicos	38
6	MATERIAL E MÉTODOS	39
6.1	Tipo de estudo	39
6.2	População de estudo	39
6.3	Locais de estudo	39
6.4	Critérios de inclusão grupo de estudo	40
6.5	Critérios de inclusão grupo controle	40
6.6	Critérios de exclusão	40
6.7	Cálculo do tamanho da amostra	40

6.8	Método	40
6.8.1	Coleta de material	40
6.8.2	Bacterioscopia	41
6.8.3	Medida de pH	41
6.8.4.	Dosagem de D e L-lactato	41
6.8.4.1	D-lactato	40
6.8.4.2	L-lactato	43
6.7	Análise estatística	44
6.8	Aspectos éticos	45
7	RESULTADOS	46
8	DISCUSSÃO	50
9	CONCLUSÕES	58
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE	65
	APÊNDICE B – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	67
	ANEXO A - PARECER CEP	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Colo Uterino

O câncer de colo uterino ou câncer cervical é uma das mais graves ameaças à saúde feminina. Estima-se que mais de um milhão de mulheres no mundo (1.474.265 casos em 2018) sejam atualmente portadoras dessa enfermidade (FONTHAM *et al.*, 2020). A maioria delas não foi diagnosticada ou não tem acesso a tratamento capaz de curá-las ou prolongar suas vidas (WHO, 2014).

O câncer cervical é considerado um tipo de câncer evitável devido ao fato de que se identificou um agente causador necessário para o surgimento da doença, o *Papilomavirus humano* (HPV). Na maioria das vezes, a infecção cervical pelo HPV é transitória e regride espontaneamente entre seis meses a dois anos após a exposição. No pequeno número de casos nos quais a infecção persiste e, especialmente, quando é causada por um subtipo viral oncogênico, pode ocorrer o desenvolvimento de lesões precursoras (lesão intraepitelial escamosa de alto grau), cuja identificação e tratamento adequado previnem a progressão para o câncer cervical invasivo (WHO, 2012).

As condições que levam à persistência da infecção pelo HPV e progressão para o câncer não são bem compreendidas, mas alguns fatores de risco podem estar envolvidos: tipo de HPV, estado imunológico, coinfeção com outras patologias sexualmente transmissíveis como infecção pelo vírus *Herpes simplex*, infecção por *chlamydia trachomatis* e infecção por *Neisseria gonorrhoeae*, paridade, tabagismo, uso de contraceptivos orais por mais de 5 anos (WHO, 2014).

O câncer do colo do útero é raro em mulheres até 30 anos, o pico de sua incidência se dá na faixa etária de 45 a 50 anos e a mortalidade aumenta progressivamente a partir da quarta década de vida (WHO, 2014).

No Brasil, estima-se em torno de 16.710 novos casos de câncer de colo uterino em 2020, correspondendo ao terceiro tipo de câncer mais incidente no país sendo antecedido apenas pelo câncer de mama feminina (59.700 casos) e cólon e reto (18.980 casos) (INCA, 2020). Por sua vez, representa também a terceira maior incidência de neoplasia maligna entre as mulheres, excluindo-se pele não

melanoma, no estado do Ceará, com um número estimado, pelo INCA, de 1.010 novos casos para o ano de 2020 (INCA,2020).

Segundo dados do *Global Cancer Observatory*, 85% dos casos de câncer cervical ocorrem nos países em desenvolvimento havendo grande variação entre as diversas regiões do planeta, pois se encontra taxas de menos de 2 por 100.000 mulheres, na Ásia Ocidental e de 27,6 na África oriental. Países europeus, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália apresentam as menores taxas, enquanto países da América Latina e, sobretudo, de regiões mais pobres da África, apresentam valores bastante elevados (WHO, 2017). No Brasil ainda convivemos com um número elevado de casos de câncer cervical comparado a diversos outros países. As taxas estimadas de incidência e mortalidade em nosso país apresentam valores intermediários em relação aos países em desenvolvimento, porém são elevadas quando comparadas às de países desenvolvidos com programas de detecção precoce bem estruturados (INCA, 2019).

Nos Estados Unidos, por exemplo, em decorrência do sucesso dos programas de rastreamento do câncer cervical, este foi superado em número de casos pelo câncer escamoso de orofaringe que se tornou o câncer relacionado ao HPV mais comum naquele país no ano de 2015 (CDC, 2018). Não obstante, nos EUA, estima-se em 13.800 o número de casos de câncer cervical invasivo diagnosticados e em cerca de 4.290 o número de mortes que irão ocorrer em 2020 (FONTHAM *et al.*, 2020).

1.1.1 Histórico do câncer de colo uterino

Foi no ano de 1928 que Dr. George Papanicolaou no departamento de anatomia da universidade de Cornell apresentou a evidência de que células cancerígenas do colo uterino poderiam ser identificadas na amostra vaginal. Dr. Papanicolaou acreditou que havia falhado em convencer os colegas da praticabilidade do seu método, mas este mais tarde se tornaria a principal forma de diagnóstico precoce de câncer de colo uterino. A adoção gradual do esfregaço de Papanicolaou como exame de rotina fez com que entre os anos de 1940 e 2005 ocorresse uma redução de cerca de 75% na incidência e de 70% na mortalidade pelo câncer de colo uterino nos Estados Unidos. Observam-se ainda hoje,

entretanto, disparidades na ocorrência da doença dentro do próprio país com maior acometimento de minorias e da população de mais baixo nível socioeconômico. Fatores genéticos podem ter influência sobre o risco de desenvolvimento de câncer cervical, mas considera-se que as diferenças citadas sejam atribuídas, sobretudo, a barreiras socioeconômicas e culturais (FISHER & BRUNDAGE, 2009).

No Brasil, o primeiro serviço de citopatologia foi fundado na Santa Casa de Belo Horizonte em 1956. (THULER, 2012). Nesse mesmo ano, Juscelino Kubitschek patrocinou a construção do Centro de pesquisa Luiza Gomes de Lemos, da Fundação das Pioneiras Sociais, possivelmente a primeira iniciativa institucional direcionada para o controle do câncer do colo do útero em nosso país.

Entre 1972 e 1975, o Programa Nacional de Controle do Câncer do Ministério da Saúde foi implementado e deu destaque ao rastreamento do câncer de colo uterino (INCA 2016). Apesar do conhecimento científico disponível, dos investimentos governamentais e das normalizações vigentes, o país conviveu por muitos anos com taxas de mortalidade por câncer de colo uterino inaceitáveis, carecendo de ações estruturadas, abrangentes e contínuas para corrigi-las. Este fato levou à elaboração do programa “Viva Mulher” em 1996 pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer), órgão responsável pela política nacional de prevenção e controle do câncer no Brasil a partir da constituição de 1988.

Em 1998 foi estabelecido um sistema de informações para o monitoramento das ações relacionadas ao câncer de colo uterino, o SISCOLO e instituído o Programa Nacional de Combate ao Câncer de Colo do Útero. Desde então, esforços são engendrados para o fortalecimento de políticas públicas de rastreio em nosso país. No ano de 2011 foram publicadas pelo INCA as Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero, estas revisadas no ano de 2016. Em 2013 foi desenvolvida uma plataforma em versão Web integrando SISCOLO e SISMAMA (sistema de informação do câncer de mama), o SISCAN, com finalidade de permitir o monitoramento das ações relacionadas à detecção precoce, à confirmação diagnóstica e ao início do tratamento de neoplasias malignas de mama e colo uterino (BRASIL, 2013).

Paralelamente ao desenvolvimento da citologia como técnica de rastreamento do CCU, se evoluiu na compreensão do processo patológico da doença. Desde o ano de 1842, quando Rigorn-Stern observou que freiras na Itália

raramente apresentavam câncer cervical e que este era comum em prostitutas, passando pela hipótese de que o vírus herpes simples 2 seria o agente causal até 1970, ano em que Zur Hausen propôs o HPV como agente causal e o ano de 1980 quando foram desenvolvidas sondas de DNA do HPV confirmando a hipótese de Zur Hausen, se passaram mais de 100 anos. De forma semelhante, houve grande progresso no conhecimento das lesões ocasionadas na cérvix uterina pelo vírus (JR MAYEAUX, COX, 2014).

O estudo da cérvix in vivo teve início após a invenção do espéculo moderno por Recamier no início do século XIX. Observou-se posteriormente que lesões brancas na cérvix chamadas de leucoplasias evoluíam para câncer de colo uterino. Hans Hinselmann desenvolveu, com o objetivo de melhor visualizar essas lesões, um microscópio binocular acoplado a uma fonte de luz. Assim nasceu a colposcopia, técnica diagnóstica utilizada atualmente para auxiliar na avaliação de lesões suspeitas no colo uterino e orientar a realização de biópsias e procedimentos incisionais e excisionais (JR MAYEAUX; COX, 2014) para diagnóstico e tratamento das lesões precursoras. O termo colposcopia foi introduzido pelo próprio Hinselmann, derivado da palavra kolpos (vagina) e skopeo (olhar com cuidado) e sua primeira publicação sobre a técnica ocorreu em 1925 (NAUD *et al.*, 2006). O colposcópico é um instrumento óptico que possibilita um exame ampliado e iluminado do trato genital inferior em maior aumento permitindo examinar-se de perto o epitélio e vasos subepiteliais e assim direcionar biópsias para a identificação de áreas de epitélio atípico na cérvix uterina (JR MAYEAUX; COX, 2014).

Os esforços são muitos, mas a implementação efetiva e abrangente dos exames citológicos, o controle de qualidade destes e o diagnóstico e tratamento das mulheres com lesões precursoras de câncer de colo uterino ainda representam um grande empecilho para a redução almejada na incidência desse tipo de câncer feminino.

1.2. Papilomavírus humano- Vírus HPV

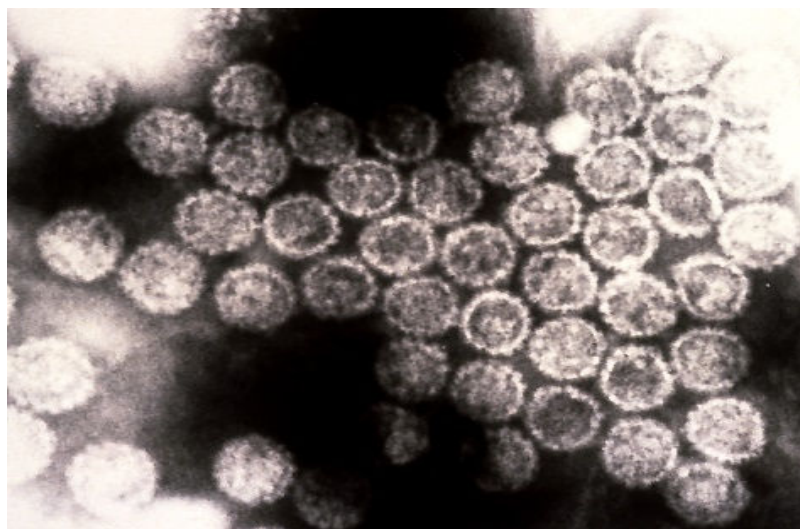
Os *Papilomavirus* são um grupo de vírus DNA que infectam o epitélio de mamíferos, aves e répteis. Eles estão associados a uma variedade de doenças que acometem animais e o homem e quando ocorrem em humanos são chamados

Papilomavirus humanos. Com atualmente 226 *Papilomavirus humanos* distintos caracterizados, a maior parte conhecida deste tipo de vírus é isolada de humanos. (VAN DOORSLAER, 2008).

Foi entre 1974 e 1976 que pesquisadores inicialmente postularam a possibilidade do vírus HPV ser o agente causador do câncer cervical. Os primeiros tipos de HPV isolados de biópsias de câncer cervical foram o HPV 16 em 1983 e o HPV 18 em 1984, pela equipe do pesquisador alemão Harald Zur Hausen (2002) ganhador do prêmio Nobel em fisiologia e medicina no ano de 2008, juntamente com Françoise Barré-Sinoussi e Luc Montaigner, os responsáveis pela descoberta do vírus HIV (ZUR HAUSEN, BARRÉ-SINO, MONTAGNIER, 2008).

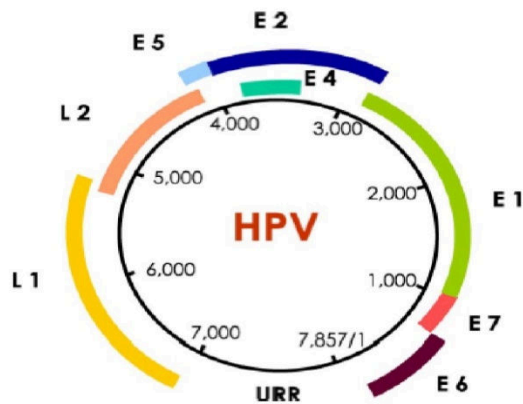
O HPV é um vírus de DNA de dupla hélice com cerca de 8000 pares de bases com um capsídeo proteico. Em seu genoma encontram-se 3 regiões, a saber: URR (reguladora), E (precoce) e L (tardia). A região E codifica proteínas da replicação viral e a região L, proteínas estruturais importantes para a formação do capsídeo, sendo esta última de fundamental importância para o desenvolvimento das vacinas. O potencial carcinogênico do HPV se relaciona com a atividade de 2 oncogenes da região precoce, E6 e E7 uma vez que E6 interage com o gene supressor tumoral p53 e E7 com o gene supressor tumoral pRb após a integração do vírus ao genoma das células epiteliais do hospedeiro (ZUR HAUSEN, 2002).

Figura 1: HPV



Fonte: WHO, 2017 (imagem HPV em microscopia eletrônica)

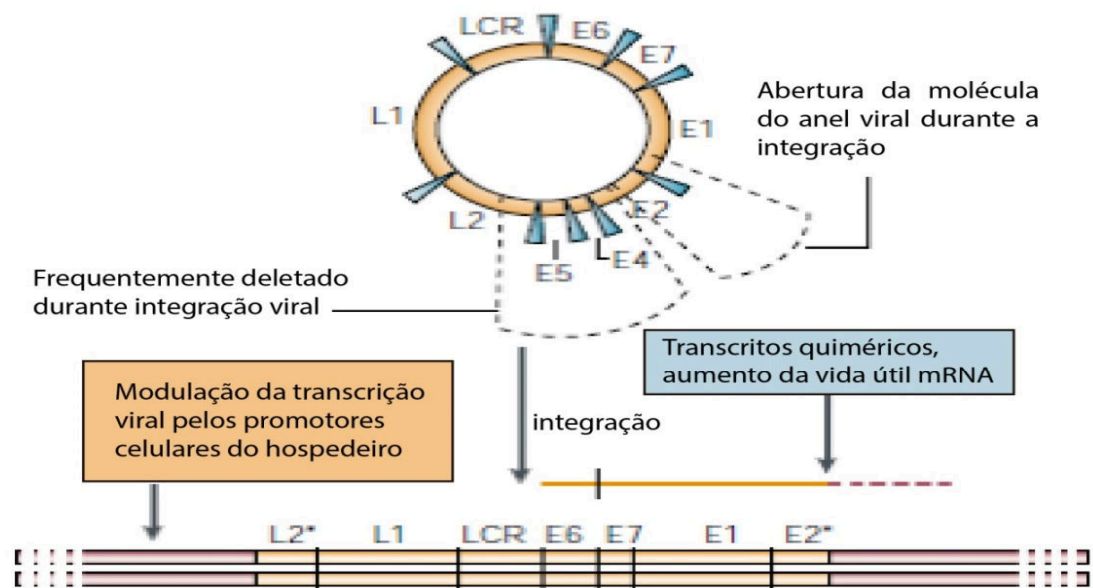
Figura 2: Estrutura do HPV



Representação esquemática do genoma do HPV mostrando a organização dos genes precoces ou não-estruturais (E), os genes do capsídeo (L1 e L2) e a região reguladora (URR).

Fonte: MUNOZ, 2006

Figura 3: HPV-Organização circular e integração ao DNA do hospedeiro.



A organização do DNA circular do HPV e sua integração ao DNA da Célula hospedeira: o genoma do HPV contém entre 6800 a 8000 pares de base e se divide em oito open reading frames (ORF)- E6, E7, E1, E2, E4, E5, L2 e L1. No desenvolvimento do câncer a molécula viral frequentemente se integra ao DNA do hospedeiro. O anel molecular mais frequentemente se abre ao nível de E2 rompendo a continuidade do gene.

Fonte: adaptado de ZUR HAUSEN, 2002

A classificação dos tipos de HPV se baseia predominantemente na similaridade da sequência de nucleotídeos com algumas propriedades biológicas e médicas específicas (HANS-ULRICH, 2010). Treze genótipos de HPV são

considerados como sendo carcinogênicos ou provavelmente carcinogênicos sendo, portanto, chamados tipos de alto risco, pois são a causa de praticamente todos os casos de câncer cervical invasivo (ex: 16,18,31,45) (GUAN, 2012). Ao contrário, os tipos virais encontrados preferencialmente em verrugas e lesões não malignas são denominados HPVs de baixo risco, tendo como exemplos principais os tipos 6 e 11 (ZUR HAUSEN, 2002). A maioria das infecções por HPV são rapidamente eliminadas pelo hospedeiro, mas os subtipos de alto risco podem persistir e causar câncer cervical ou outros tipos de câncer (SHANNON *et al.*, 2017).

A infecção pelo *Papilomavírus humano* é a doença sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo. Estima-se, baseado em uma metanálise de 1 milhão de mulheres, um total de 291 milhões de mulheres apresentando HPV no colo uterino em algum momento de suas vidas (CROSBIE, EINSTEIN, FRANCESCHI, 2013). O risco de contágio pelo vírus ao longo da vida é estimado em 80% (SNIJDERS *et al.*, 2006).

A via preferencial de transmissão do HPV é a sexual e requer contato pele-pele, mucosa-mucosa ou pele-mucosa. Entretanto, a forma de transmissão sexual não é exclusiva. Podemos encontrar soropositividade para o HPV em crianças e adolescentes transmitido horizontalmente através de contato com mãos infectadas ou objetos. A transmissão vertical através da mãe para o feto durante a gravidez também foi relatada (KERO, RAUTAVA, 2019).

A grande maioria das infecções pelo HPV são transitórias e o vírus é eliminado completamente a depender do sistema imunológico do indivíduo portador do vírus. Quando o organismo falha em eliminar o HPV, porém, e a infecção se torna persistente, é este o fator de risco mais significativo para o câncer cervical. Fato demonstrado por estudos de caso-controle extensos e estudos epidemiológicos prospectivos (KERO, RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2017).

Como fatores de risco para infecção pelo *Papilomavírus humano* encontramos: início precoce da primeira relação sexual, número elevado de parceiros sexuais durante a vida e antecedentes de uma ou mais doenças sexualmente transmissíveis (JR MAYEAUX, COX, 2014).

Os fatores de risco para a persistência e progressão do HPV, por sua vez, são imunodeficiência, tipo de HPV, tabagismo, uso de contraceptivos orais e

infecção por *Chlamydia trachomatis* (CROSBIE, EINSTEIN, FRANCESCHI, 2013)

O HPV é um potente carcinógeno humano considerado uma causa de câncer em outros sítios além do colo uterino, entre os quais podemos citar como exemplos, o câncer anal, de pênis, vagina, vulva e de orofaringe. Um total de 5% de todos os cânceres tem sido atribuído a este agente infeccioso (CROSBIE, EINSTEIN, FRANCESCHI, 2013). Ele infecta as células da camada basal do epitélio provavelmente através de microlesões na superfície da pele ou mucosa. As células infectadas proliferam lateralmente e a replicação viral acontece após as células chegarem à camada suprabasal. Na sequência, nas camadas superficiais, partículas virais completas são formadas e liberadas podendo contaminar outros tecidos (ZUR HAUSEN, 2002).

Herfs *et al.*, (2012) descreveram uma camada única de células epiteliais cuboidais na cérvix uterina localizadas na junção escamocolunar, denominadas células juncionais escamocolunares, com um perfil de expressão único de genes e características embrionárias, relacionadas a carcinoma cervical associada ao HPV, pois os marcadores de células juncionais são encontrados em carcinomas escamosos e adenocarcinomas originários do colo uterino.

Nas células infectadas, as oncoproteínas virais E6 e E7 bloqueiam a atividade dos supressores tumorais p53 e pRb causando resistência a apoptose celular e aumento da instabilidade genômica contribuindo para a tumorigênese (ZUR HAUSEN 2002).

O sistema imunológico nesse contexto se torna importante no controle do processo. A retenção intracelular dos antígenos virais até que as células atinjam as camadas mais superficiais compromete a imunodeteção do vírus, especialmente se este possui mecanismos moleculares que limitem a apresentação dos epítomos ao sistema imune nas camadas celulares basais (DOOBAR, 2005). Como mecanismos de escape dos tipos virais de alto risco Crosbie cita redução da expressão de CDH1 pelas células epiteliais, inibição da transcrição TLR-9 por E6 e E7, redução da expressão de TAP1 e posterior inibição da ativação de linfócitos T citotóxicos, inibição da síntese de interferon, inibição da expressão de citocinas pro-inflamatórias e ativação das citocinas anti-inflamatórias.

A maioria das lesões decorrentes da infecção pelo *Papillomavirus humano*

regredir em cerca de 6-12 meses apesar do complexo mecanismo de escape imunológico viral. A imunidade celular é a principal responsável pela proteção do hospedeiro e regressão das lesões. A imunidade humoral previne novas infecções, mas não participa do mecanismo de regressão de lesões causadas pelo HPV (SNIJDERS *et al.*, 2006).

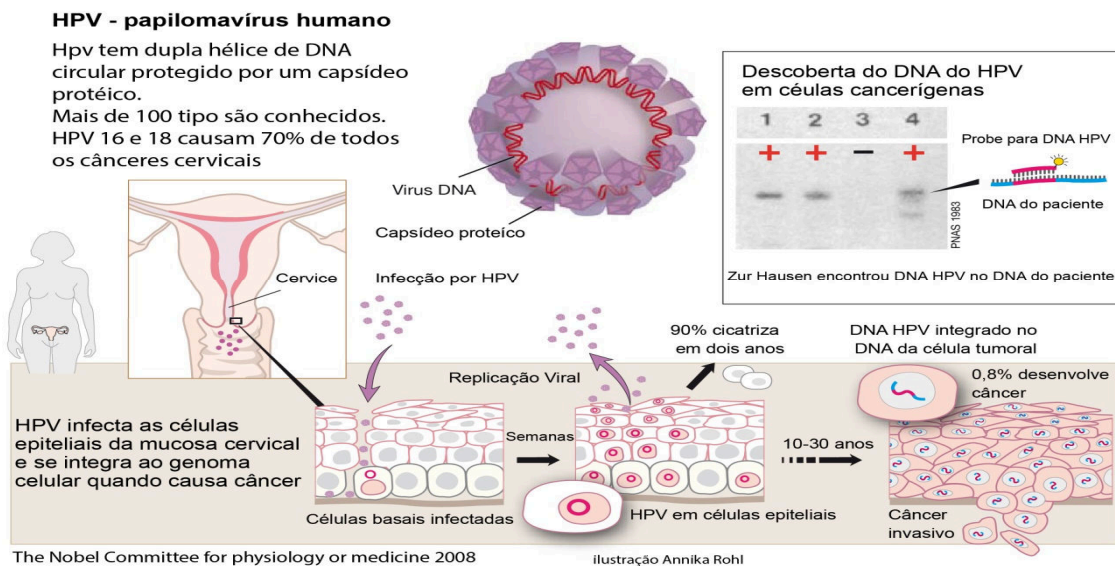
Em mulheres jovens, a incidência do HPV é relativamente alta, taxas de persistência e progressão são baixas, e regressão das anormalidades precursoras é alta quando comparada com outros grupos de faixas etárias mais elevadas (FONTHAM *et al.*, 2020).

Em uma pequena percentagem das infecções ocorre a integração ao genoma celular do hospedeiro e a expressão dos transcritos dos oncogenes virais emerge como um fator de progressão importante das lesões decorrentes da infecção pelo HPV (SNIJDERS *et al.*, 2006).

Assim, após integração viral, ocorre falha do sistema imunológico em eliminar o vírus seguindo-se de infecção persistente, o HPV se integra ao genoma, leva à transformação celular e, no colo uterino, ocasiona o desenvolvimento das lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) que podem progredir para o câncer invasor (ZUR HAUSEN, BARRÉ-SINO, MONTAGNIER, 2008).

Em metanálise de Guan, Howell-Jones, Li (2012), a prevalência de HPV aumentou de acordo com a gravidade da doença cervical de 12% em pacientes cujo laudo citológico foi normal para 89% nos casos de carcinoma cervical invasor (GUAN, HOWELL-JONES, LI 2012). O mesmo autor evidencia ainda que a positividade do HPV 16 se eleva através da progressão de citologia normal para câncer cervical invasor em todas as regiões do mundo em estudos de coorte o que mostra um maior risco, a longo prazo, de HSIL ou câncer cervical invasor em decorrência de contágio pelo HPV 16 que permanece como a causa de mais da metade de casos de CCI em todo o mundo.

Figura 4: HPV-evolução



Fonte: adaptado de ZUR HAUSEN, BARRÉ-SINO, MONTAGNIER, 2008.

1.3 Lesões Intraepiteliais de Baixo e de Alto Grau (Low and High Grade Intraepithelial Lesions [LSIL/HSIL]) e Câncer Cervical.

As lesões intraepiteliais são a consequência do efeito citopático do *Papilomavírus humano* no tecido epitelial do colo uterino e podem ser diagnosticadas através de uma biópsia da amostra do tecido (INCA, 2016) em local acometido identificado através do exame colposcópico.

As LSILs são consideradas infecções virais produtivas com baixo risco de progressão para câncer e alto índice de remissão espontânea especialmente em pacientes jovens com menos de 30 anos (INCA, 2016).

As HSILs, por outro lado, ocorrem em decorrência da persistência do vírus no epitélio e são consideradas lesões precursoras do câncer de colo uterino. Foi estimado que, em 70% das mulheres afetadas, as lesões podem persistir e progredir para câncer cervical depois de 10 a 20 anos (D'ALESSANDRO, 2018). Por este motivo, o tratamento excisional está preferencialmente indicado após este diagnóstico (INCA, 2016).

Na colposcopia, as lesões de baixo grau costumam ser evidenciadas como epitélio acetobranco estreito, menos denso e menos extenso, com margens

irregulares, chanfradas, geográficas ou angulares e com pontilhado e/ou mosaico fino; às vezes, as lesões de baixo grau são separadas da junção escamocolunar e, raras vezes, contêm vasos atípicos. Por outro lado, as lesões de alto grau estão associadas com áreas que após aplicação de ácido acético adquirem coloração branca densa, opaca, branco-acinzentada, com pontilhado e/ou mosaico grosseiros e com margens regulares e bem delimitadas; essas lesões com frequência incluem ambos os lábios da cérvix e, às vezes, podem conter vasos atípicos (SELLORS, SANKARANARAYANAN, 2004).

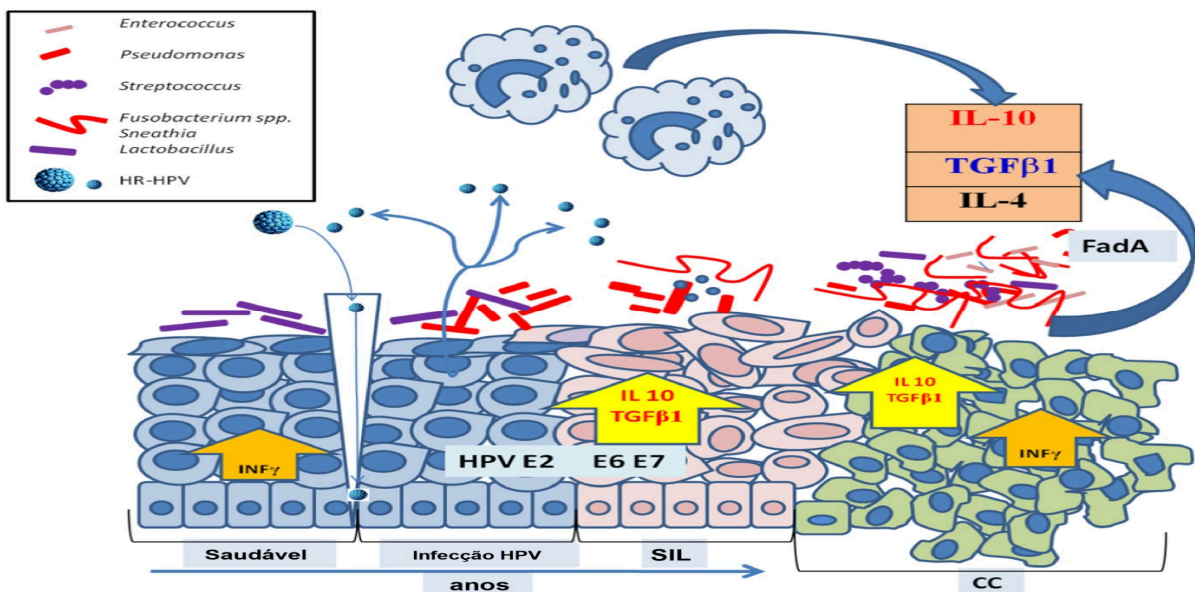
Existem evidências de que infecções por HSV-2, *Chlamydia* e HIV estejam relacionadas com a progressão das lesões intraepiteliais e patogênese do câncer de colo de útero (MUNOZ *et al.*, 2006).

1.4 Microbioma Vaginal

Estudo dos autores Wiil *et al.*, (2019) procuram demonstrar ainda que uma microbiota vaginal mais diversificada e com menor população de lactobacilos também estaria relacionada com maior possibilidade de persistência do vírus HPV e consequentemente com surgimento de lesões de alto grau e evolução para câncer cervical.

O câncer cervical é uma doença que se desenvolve lentamente e que apresenta estágios que o antecedem no qual as condições do microambiente cervical e vaginal são modificadas, incluindo acidez vaginal e padrão de citocinas levando a um estado de imunossupressão local. Em um microambiente relacionado ao câncer cervical, a presença de citocinas imunossupressoras (TGF- β 1, IL-10) favorece a persistência do HPV e a microbiota vaginal anormal tem sido associada à aquisição da infecção pelo HPV (AUDIRAC-CHALIFOUR *et al.*, 2016). Esse mesmo estudo sugere o mecanismo representado na figura abaixo levando a progressão para o CCU.

Figura 5: Mudanças de microbioma durante o desenvolvimento de imunossupressão.



Mecanismo sugerido para mudanças de microbioma durante o desenvolvimento de imunossupressão.

O epitélio cervical está representado em cada estágio de câncer cervical iniciando de um epitélio normal e sua modificação longitudinal quando um HPV de alto risco infecta e progride para lesão Intraepitelial e câncer. A diversidade e composição do microbioma esta representado de acordo com a principal bactéria por estágio. *Lactobacillus* representados por retângulos roxos, *Pseudomonas oleovorans* por retângulos vermelhos, *Fusobacterium* e *Sneathia* por bastões, *Streptococcus agalactiae* por círculo roxo e HPV por círculo azul. após a infecção, o microbioma muda e sua diversidade aumenta. As proteínas E2, E6 e E7 aumentam a expressão de IL-10 e a presença de macrófagos tipo 2. As toxinas produzidas pela microbiota mais diversificada danifica as junções celulares (tight junctions) e promovem metástase de forma similar ao carcinoma de cólon.

FONTE: (AUDIRAC-CHALIFOUR *et al.*, 2016)

O microbioma influencia os humanos em muitos aspectos ainda subapreciados incluindo, mas não limitado a desenvolvimento e crescimento, imunidade, metabolismo e até comportamento. A disbiose microbiana pode resultar em doença e crescimento excessivo de patógenos oportunistas que podem por em risco a saúde e a vida da humanidade (HUANG *et al.*, 2014).

O processo de carcinogênese também pode sofrer a influência do microbioma humano. O mais famoso e melhor estudado exemplo do papel de bactérias envolvidas na carcinogênese é o do *Helicobacter pylori* levando ao linfoma MALT e ao adenocarcinoma gástrico. Pesquisas sobre microbioma intestinal mostram que inflamação crônica parece ser o principal mecanismo pelo qual algumas espécies de bactérias podem influenciar no desenvolvimento de câncer. No entanto, outras bactérias podem ter efeito protetor contra essa patologia através de estímulo de apoptose, redução de radicais livres, ativação de genes supressores

tumorais ou ainda estímulo do sistema imune (CHAMPER *et al.*, 2018).

É bem conhecido o fato de que um microbioma vaginal balanceado é importante para a manutenção da saúde do trato genital feminino e prevenção de infecções vulvo-vaginais, inclusive reduzindo o risco de transmissão de HIV como evidenciado por Core RA (CORE, 2014).

O Projeto Microbioma Humano concluiu que as comunidades microbianas vaginais são relativamente simples em comparação com a oral e intestinal, mas apresentam uma maior diversidade de lactobacilos (ZUR HAUSEN, 1996). O projeto mostrou ainda que a variabilidade da microbiota ao longo do tempo no indivíduo é menor que a variabilidade entre as populações, inclusive para a vagina, além de que outros estudos também mostraram que a maioria das mulheres tem um microbioma vaginal estável (VAN DE WIJGERT *et al.*, 2014).

A prevalência das comunidades bacterianas varia significativamente entre diferentes grupos raciais e étnicos. Esta observação é importante porque diferenças na composição microbiana podem influenciar em como as comunidades vaginais respondem a infecções e outros desequilíbrios (HUANG *et al.*, 2014).

Entre os fatores que influenciam diretamente na composição da microbiota vaginal podemos citar: gestação, o uso de contraceptivos, relações sexuais, duchas vaginais, fase do ciclo menstrual, o uso de antibióticos e status imunológico (LINHARES, GIRALDO, BARACAT, 2010).

Para a manutenção do equilíbrio do ecossistema vaginal, vários mecanismos de defesa atuam de forma sinérgica, entre eles: a integridade e o trofismo da mucosa, a produção de muco protetor, o pH vaginal, a microbiota colonizadora da vagina e o sistema imunológico propriamente dito (BEGHINI, GIRALDO, ELEUTÉRIO JR, 2016).

1.4.1 LACTOBACILOS E ACIDO LÁTICO

Os lactobacilos são considerados os principais constituintes da microbiota vaginal saudável (LINHARES, GIRALDO, BARACAT, 2010). O *Homo sapiens* é a única espécie conhecida cuja comunidade vaginal é dominada por *Lactobacillus spp.* (WITKIN *et al.*, 2013). O gênero *Lactobacillus* compreende mais de 130 espécies produtoras de ácido lático que habitam diversos ambientes e das quais mais de 20

foram evidenciadas na vagina sendo as mais comuns *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* e *Lactobacillus gasseri* (HUANG *et al.*, 2014).

Ravel *et al.*, (2011) estudando as comunidades bacterianas vaginais de 396 mulheres norte-americanas assintomáticas representando 4 grupos étnicos (brancas, negras, hispânicas e asiáticas) caracterizou por pirosequenciamento genes 16S rRNA. A análise revelou 5 grupos principais de comunidades microbianas designados I, II, III, IV, e V. As comunidades do grupo I eram dominadas por *L. crispatus*, enquanto nos grupos II, III e V eram dominadas por *L. gasseri*, *L. iners*, and *L. jensenii*, respectivamente. As comunidades remanescentes formaram um grande e heterogêneo grupo (IV) e se caracterizaram por elevadas proporções de bactérias estritamente anaeróbias incluindo *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Finegoldia*, and *Mobiluncus*.

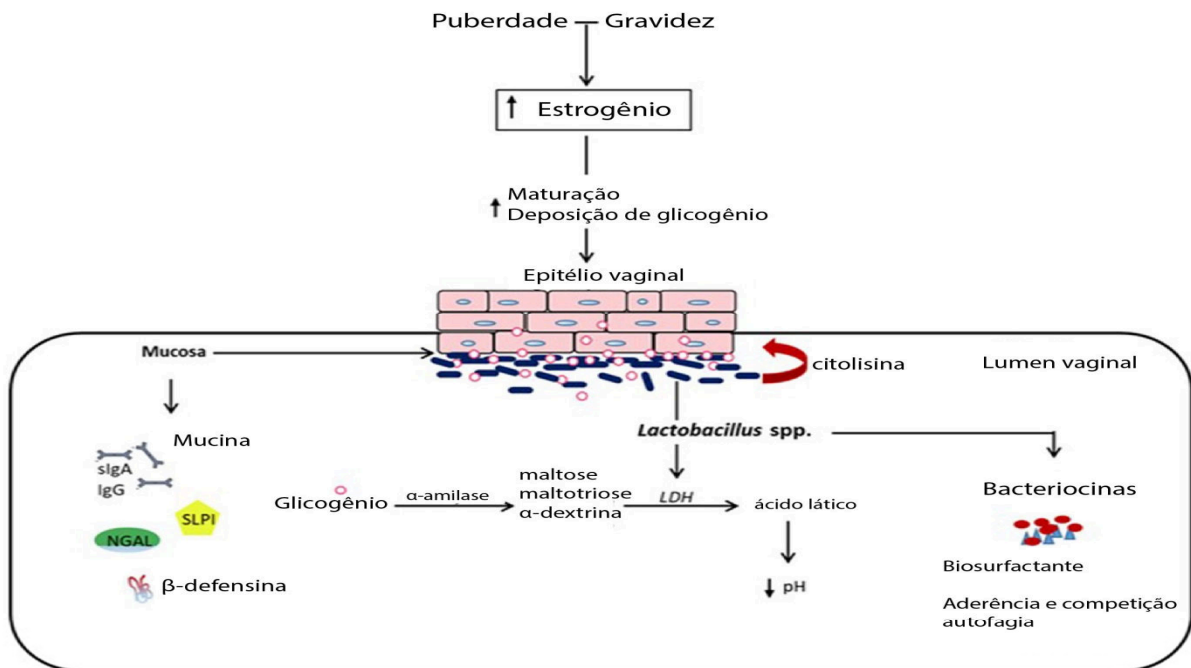
A presença dos *Lactobacillus* mantém o pH vaginal das mulheres entre 3,8 e 4,5 através da produção de ácido láctico. Esse nível de acidez é bem tolerado pelos lactobacilos, mas inóspito para outros tipos de bactérias. Algumas outras bactérias como *Atopobium*, *Megasphaera* e *Leptotrichia*, no entanto, também são capazes de produzir ácido láctico (NASIOUDIS, LINHARES, LEDGER, 2017). Surpreendentemente, muitas dessas bactérias produtoras de ácido láctico, podem ser abundantes em mulheres saudáveis especialmente hispânicas e negras. Isto pode significar que para uma vagina saudável o que realmente importa não é a presença de lactobacilos, mas sim a existência de ácido láctico e de um pH ácido (HAYA *et al.*, 2014). A manutenção do pH vaginal ácido pelos lactobacilos, assim como por outras bactérias produtoras de ácido láctico é fundamental para reduzir a probabilidade de infecção por microrganismos patogênicos. Esta substância promove a ativação dos linfócitos T Helper 17 que atuam na defesa contra microrganismos extracelulares e aumentam a liberação de IL-1 β e IL-8 (NASIOUDIS, LINHARES, LEDGER, 2017).

A produção de ácido láctico foi demonstrada *in vivo* e é o único mecanismo que tem relevância biológica conhecida na defesa vaginal contra patógenos (SPURBECK, ARVIDSON, 2011).

Sob a influência do estrogênio, o glicogênio é depositado nas células epiteliais vaginais e metabolizado em glicose. A enzima lactato desidrogenase, produzida

pelos lactobacilos presentes no ambiente vaginal, metaboliza a glicose produzindo ácido láctico, responsável por manter o pH vaginal ácido. A microbiota dominada por lactobacillus está associada com níveis mais elevados de ácido láctico quando comparado com outros metabólitos e acidifica a vagina através da produção e manutenção da concentração vaginal de ácido láctico de 1% com uma mistura aproximadamente racêmica de isômeros D e L (ALDUNATE *et al.*, 2013).

Figura 6: Efeito Eubiótico do estrogênio e Lactobacilos sobre o meio vaginal



Efeito eubiótico do estrogênio e lactobacilos sobre o meio vaginal. Na puberdade e durante a gravidez os níveis elevados de estrogênio promovem a maturação e deposição do glicogênio nas células epiteliais vaginais. Glicogênio de células esfoliadas é metabolizado a ácido láctico pelo *Lactobacillus spp.* O ácido láctico estimula a lise das células epiteliais a aumenta a disponibilidade de glicogênio, favorece a proliferação de lactobacilli e inibe o crescimento de organismos patogênicos. Isto é reforçado pela produção de peróxido de hidrogênio. Bacteriocinas e surfactantes assim como inibição da adesão ao epitélio. Adicionalmente há produção concomitante de mucina, imunoglobulinas, inibidor de protease de leucócitos (SLPI), lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos (NGAL) e beta defensas.

Fonte: Adaptado de AMABEBE, ANUMBA, 2018.

Os lactobacilos produzem ácido láctico em sua forma levógira (L) e/ou dextrógira (D) a depender do número de cópias de genes da enzima lactato desidrogenase L ou D presentes no seu genoma. As concentrações finais de cada isômero na vagina geram uma proporção que parece ter implicação no papel de defesa atribuído a cada espécie de lactobacillus. A célula epitelial vaginal também produz ácido láctico, mas apenas em sua forma isomérica levogira (AcL-L) e em pequenas concentrações, sendo responsável por até 20% do ácido láctico presente

na cavidade vaginal (ALDUNATE *et al.*, 2013).

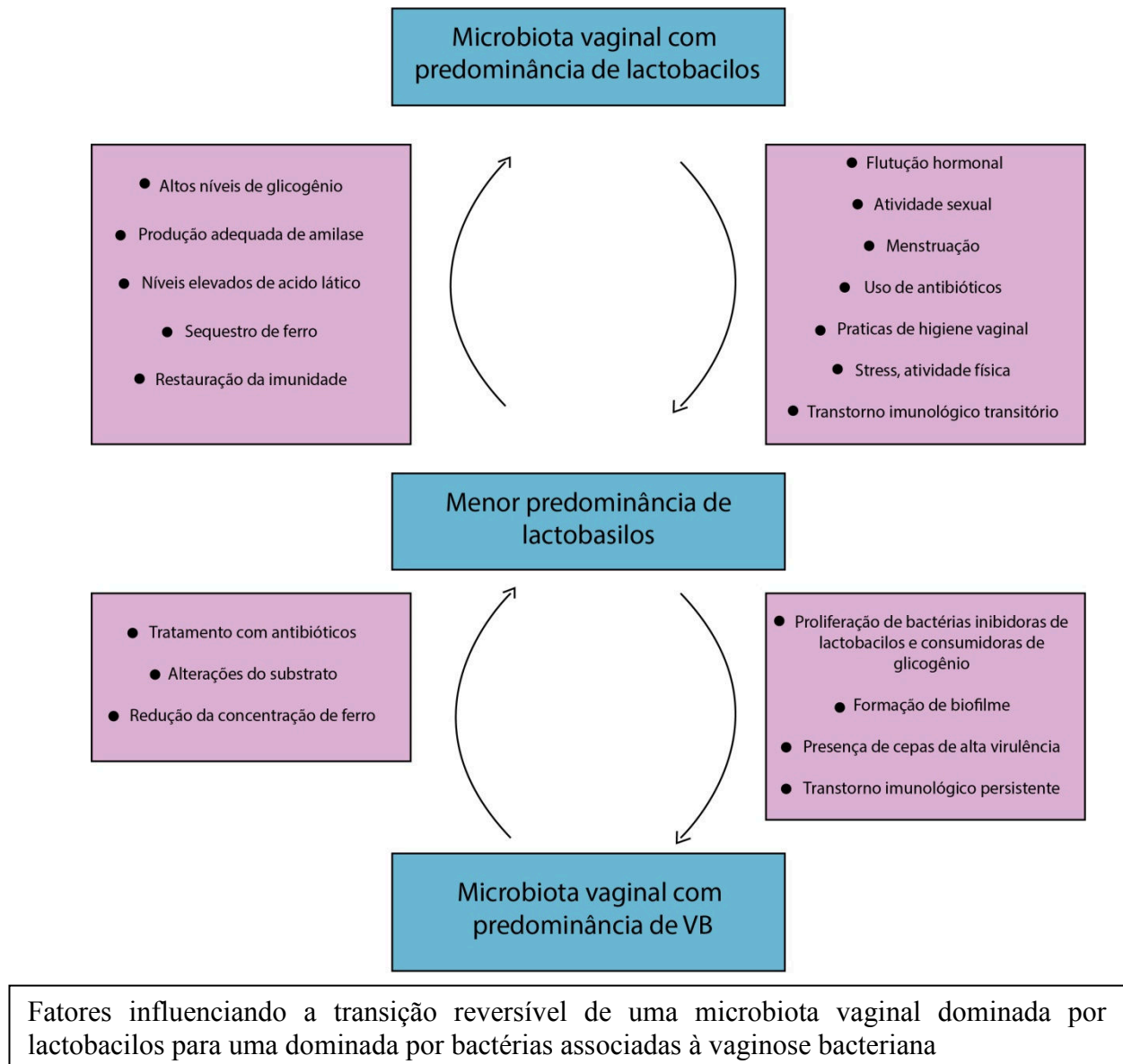
O D-ácido láctico tem maior atividade protetora contra a disbiose vaginal que o L-ácido láctico e seus níveis são mais elevados quando *L.crispatus* é a espécie dominante e mais baixo quando *L.iners*, *Gardnerella* ou *Streptococcus* predominam. (AMABEBE, ANUMBA, 2018).

O AcL-L potencializa a habilidade das células epiteliais vaginais em reconhecer e responder à presença de patógenos, induz a migração de células imunes para a vagina em resposta aos sinais produzidos pela célula epitelial vaginal, e estimula repostas antimicrobianas nas células (MOSSOP *et al.*, 2011). O L-acido láctico apresenta propriedades imunes como estímulo de IL-23/IL-17, indução de citocinas pro-inflamatórias pelas células epiteliais na presença de RNA viral sintético, indução da angiogênese tumoral e inibição do crescimento bacteriano (WITKIN *et al.*, 2013).

Estudo de Aldunate *et al.*, (2013) demonstrou que AcL-L é mais potente na inativação do HIV-1 que ácido acético e acidez isolada e notavelmente mulheres portadoras de lactobacilos vaginais têm um risco reduzido de liberação de HIV-1 enquanto as bactérias associadas à vaginose bacteriana aumentam esse risco. A menor presença do RNA do HIV em mulheres soropositivas com uma microbiota dominada pro lactobacillus pode estar relacionada ao impacto dos lactobacilos e/ou ácido láctico na resposta imune inata da vagina (ALDUNAT *et al.*, 2013).

Ácido láctico em concentrações fisiológicas acidifica o conteúdo vaginal, aumenta a atividade protetora de H₂O₂ e bacteriocinas e inibe infecções como *G. vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *herpes simplex virus* (HSV), *human papillomavirus* (HPV), HIV etc (AMABEBE, ANUMBA, 2018).

Figura 7. Transição da microbiota vaginal



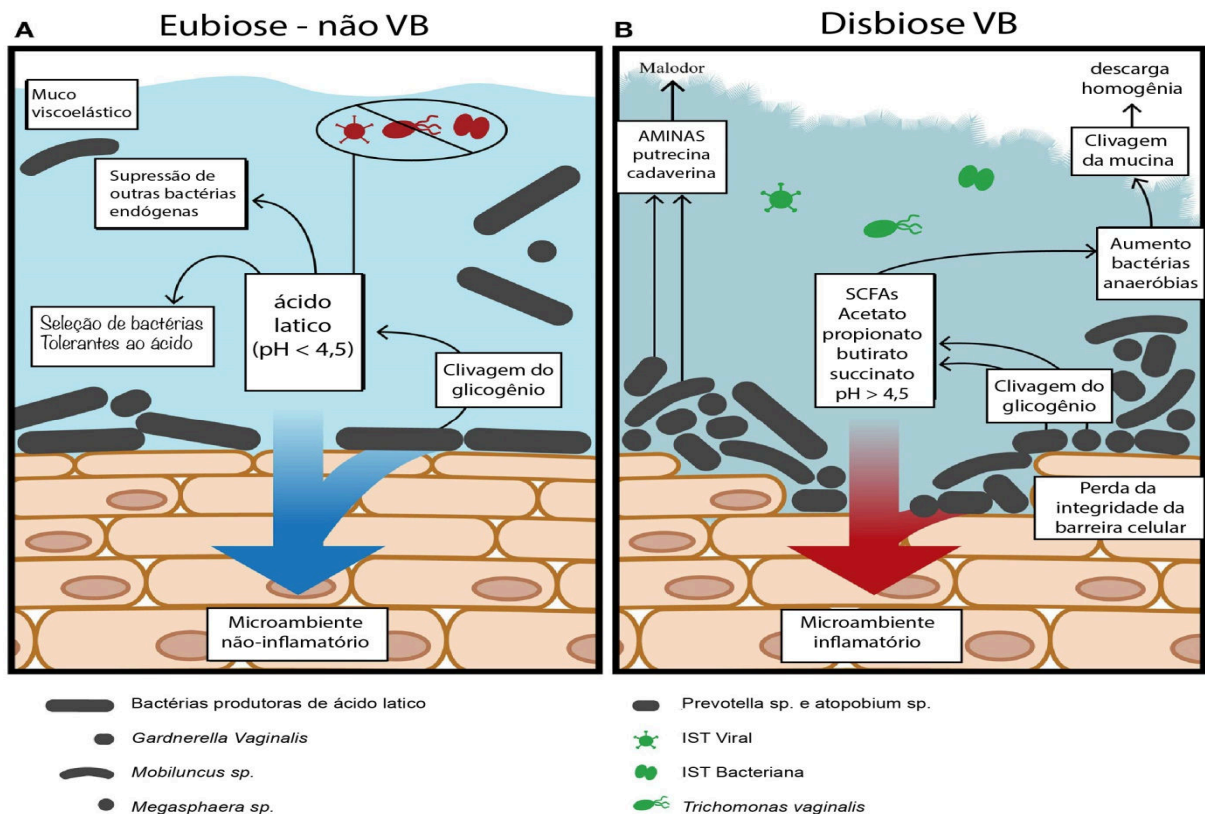
1.4.2 VAGINOSE BACTERIANA

As vulvovaginites mais comuns que acometem as mulheres em idade reprodutiva são a vaginose bacteriana (VB) e a candidíase vulvovaginal (CVV), respondendo por 22% a 50% e 17% a 39% das mulheres sintomáticas, respectivamente

Vaginose bacteriana é uma síndrome caracterizada por elevação do pH vaginal, descarga vaginal leitosa e odor de aminas ou de peixe decorrente de um desvio na microbiota vaginal que passa a ser dominada por espécies como

Gardnerella vaginalis, *Bacteroides spp.*, *Mobiluncus spp.* e *Mycoplasma hominis* em detrimento dos *Lactobacillus spp.* As mulheres podem ser assintomáticas ou apresentarem sinais clínicos como pH >4,5, corrimento vaginal típico, presença de células-chave e odor de aminas após reação do conteúdo vaginal com KOH. O diagnóstico pode ser feito pela presença dos sintomas acima e por técnicas laboratoriais tais como cultura, bacterioscopia após coloração por Gram e teste de aminopeptidase (NUGENT, KROHN, HILLIER, 1991). Esse tipo de microbiota está associada com concentrações distintas de ácidos graxos de cadeia curta e ácido succínico além de ácido butírico e propiônico no trato reprodutivo inferior feminino (DELGADO-DIAZ *et al.*, 2020).

Figura 8: O microambiente vaginal durante estados alternativos de eubiose e VB.



Fonte: adaptado de ALDUNATE, 2015

Nugent, Krohn, Hillier (1991) objetivando determinar a variabilidade do método de diagnóstico através da coloração por Gram dos esfregaços vaginais entre centros de pesquisa, desenvolveram um sistema de escores utilizando a identificação de morfotipos nas lâminas coradas pela técnica de Gram.

Figura 9: Score de Nugent

Sistema de escores (0 a10) para esfregaço vaginal corado pelo Gram ^a

Escores ^B	Lactobacilus	Gardnerella e bacteroides spp.	Bastões curvos gram variáveis
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ or 2+
2	2+	2+	3+ or 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

A-morfotipos são contabilizados pelo número médio visualizados em campo de imersão. Um peso menor é dado para bastões gram variáveis. Escore total= lactobacilli + *G. vaginalis* e *Bacteroides* spp. + bastões curvos.

B – 0, sem morfotipos presentes; 1, <1 morfotipo presente; 2, 1 a 4 morfotipos presentes; 3, 5 a 30 morfotipos presentes; 4, 30 ou mais morfotipos presentes.

Fonte: adaptado de NUGENT, KROHN, HILLIER, 1991

Nos esfregaços são identificados: bastões gram-positivos longos (*Lactobacillus*), bastões curtos gram-variáveis (*Gardnerella vaginalis*), bastões gram-negativos pequenos (*Bacteroides* spp.), bastões curvos gram-variáveis (*Mobiluncus* spp.) e cocos gram-positivos. A quantificação de acordo com o número de morfotipos por campo de imersão é feita da seguinte forma: 0=nenhum morfotipo, 1+ = menos de 1 morfotipo, 2+ = 1 a 4 morfotipos, 3+=5 a 30 morfotipos, 4+= 30 ou mais morfotipos. Para cada quantidade de morfotipo se correlaciona um determinado escore. Somando-se esses escores obtêm-se valores que caracterizam vaginose bacteriana a partir de 7, microbiota intermediária entre 4 e 6 e microbiota normal entre 0 e 3 (NUGENT, KROHN, HILLIER, 1991).

No território da pesquisa científica, VB é comumente diagnosticada através do escore de Nugent que é mais confiável e apresenta maior reprodutibilidade e sensibilidade quando comparado aos critérios de Amsel apesar da necessidade de profissional experiente na avaliação das lâminas. (AMABEBE, ANUMBA, 2018).

Estudos de biologia molecular encontraram associação consistente entre maior diversidade bacteriana e/ou maior quantidade de bactérias associadas à vaginose bacteriana com maior elevação de pH e escore de Nugent (VAN DE WIJGERT *et al.*, 2014).

Muitas ISTs induzem resposta imune e inflamação genital que podem tornar

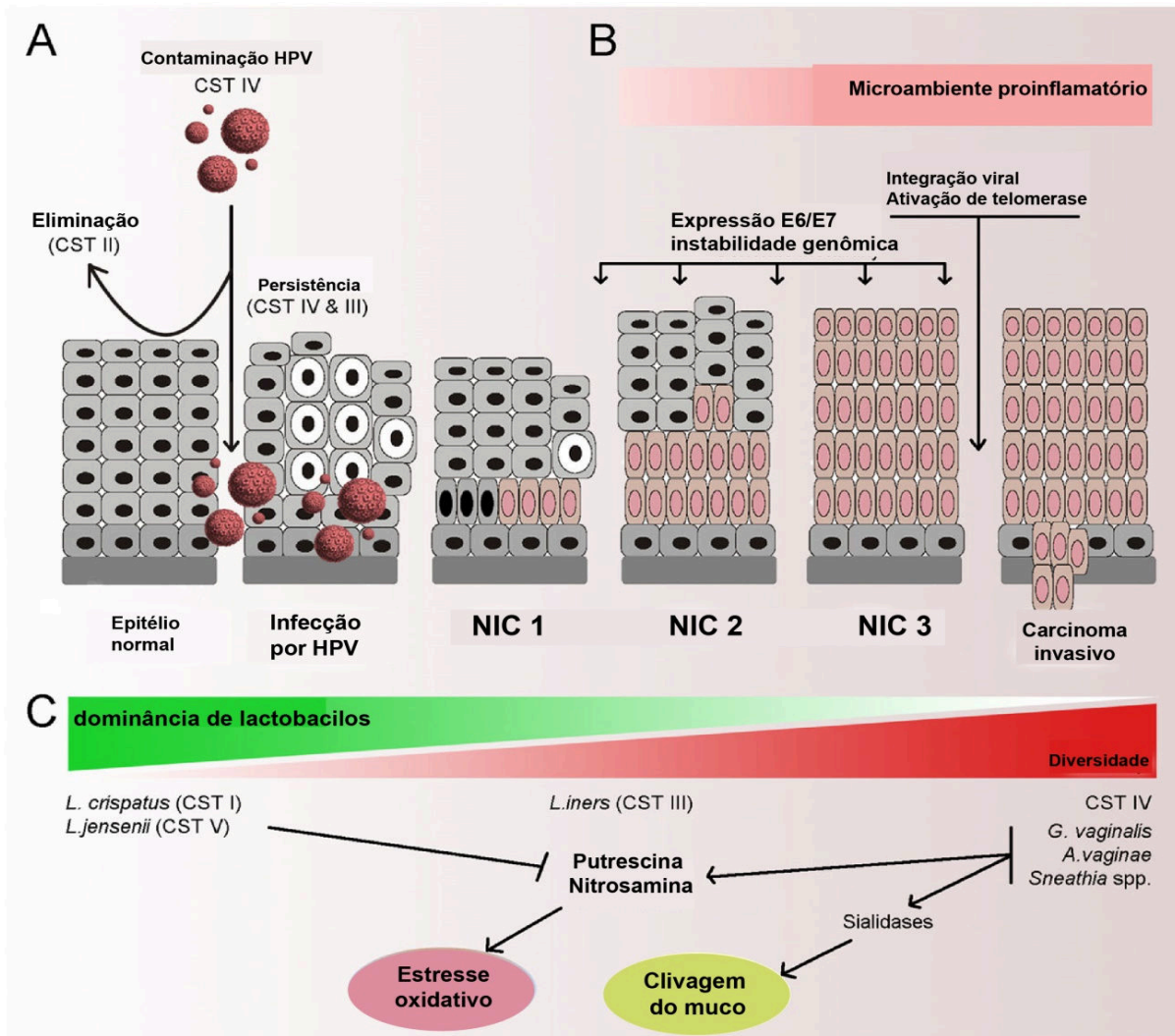
os indivíduos mais suscetíveis à infecção pelo HIV e o risco de aquisição desse vírus é 60% maior no contexto de vaginose bacteriana presente (SHANNON, YI, PERUSINI, 2017). Mulheres diagnosticadas com vaginose bacteriana pelos critérios de Nugent têm um risco 1,53 vezes maior se contaminar por HIV que mulheres sem VB (DELGADO-DIAZ *et al.*, 2020).

Susceptibilidade à infecção pelo HPV e a capacidade do sistema imune em eliminar o vírus pode ser afetada por quadros vaginais que causam uma ruptura do ecossistema, como por exemplo, a vaginose bacteriana. Estudo realizado por Castro Sobrinho no Brasil entre 211 mulheres apresentando diagnóstico de lesões intraepiteliais mostrou associação entre vaginose bacteriana e NIC 2 ou pior independentemente do subtipo de HPV encontrado (DE CASTRO-SOBRINHO *et al.*, 2016).

Motevaseli e colaboradores (2012) encontraram uma associação positiva entre pH vaginal elevado e LSIL. King et al mostrou que VB estava associada com taxas elevadas de HPV e com eliminação do vírus mais lenta (MOTEVASELI, E.; SHIRZAD, M.; AKRAMI, 2012). Shannon *et al.*, (2017), encontrou uma maior quantidade de células de Langerhans em pacientes que eliminaram o HPV e também uma associação entre contaminação pelo HPV e microbiota vaginal com menor quantidade de lactobacilos e maior quantidade de bactérias anaeróbias (SHANNON *et al.*, 2017).

Têm-se demonstrado que mulheres infectadas por HPV apresentam redução dos lactobacilos e maior diversidade da microbiota vaginal (GAO *et al.*, 2013) assim como se tem demonstrado associação entre a microbiota vaginal e a taxa de *clearance* do vírus. (KERO, RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2017). Dessa forma, recentemente se propôs que as comunidades microbianas locais podem influenciar a aquisição e persistência do HPV e subsequente desenvolvimento de câncer (HONGWEI *et al.*, 2018).

Figura 10: Resumo dos principais mecanismos associando vaginose bacteriana à doença cervical.



Resumo dos principais mecanismos associando vaginose bacteriana à doença cervical.

A-Vaginose bacteriana parece estar associada com aquisição e persistência da infecção pelo HPV e flora tipo CST II associada a um clearance mais rápido da infecção pelo HPV

B-Disbiose pode resultar em microambiente inflamatório que facilita expressão de E6 e E7, instabilidade genômica, integração viral e ativação da telomerase.

C-Maior diversidade com menor população de lactobacilos foi associada a gravidade de NIC

Fonte: adaptado de Mitra *et al.*, 2016

2. JUSTIFICATIVA

O câncer escamoso de colo uterino apresenta estágios pré-invasivos passíveis de tratamento, portanto a pesquisa e o conhecimento a respeito dos cofatores que tenham relevância no processo de carcinogênese, entre eles a microbiota vaginal, pH e lactato são de fundamental importância. Dado a alta prevalência dos casos de câncer de colo uterino em nossa população, sua estreita correlação com o vírus HPV e à possível interação deste patógeno com as bactérias que compõem o microambiente vaginal, necessitamos desenvolver pesquisas no intuito de contribuir para controle do câncer de colo uterino que além de apresentar elevada mortalidade é uma doença cujo tratamento é devastador com relação à qualidade de vida, função sexual e reprodutiva de inúmeras mulheres.

3. PERGUNTAS DE PARTIDA

A composição da microbiota vaginal apresenta associação com os tipos de lesões de colo uterino relacionadas com a infecção pelo vírus HPV?

Existe associação entre pH e os tipos de lesões de colo uterino relacionadas com a infecção pelo vírus HPV?

Existe associação entre concentração de L-lactato e os tipos de lesões de colo uterino relacionadas com a infecção pelo vírus HPV?

Existe associação entre concentração de D-lactato e os tipos de lesões de colo uterino relacionadas com a infecção pelo vírus HPV?

Há uma correlação entre as características da microbiota vaginal e níveis de Lactado-D ou L, conforme o tipo de lesão escamosa?

4. HIPÓTESE

A composição da microbiota vaginal, medida de pH da cavidade vaginal e a concentração dos isômeros de lactato em conteúdo vaginal estão relacionados com os tipos de lesões intraepiteliais cervicais induzidas pelo vírus HPV e com o câncer de colo uterino.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar a microbiota vaginal, por bacterioscopia por Gram utilizando score de Nugent, medir pH e dosar D-lactato e L- lactato em mulheres com diagnóstico histopatológico de LSIL/HSIL e câncer de colo de útero e de controles sem alterações.

5.2 Objetivos Específicos

- Determinar o tipo de microbiota vaginal por bacterioscopia por Gram (escore de Nugent), medir pH vaginal, dosar D-lactato e L- lactato em mulheres sem lesão intraepitelial escamosa.
- Determinar o tipo de microbiota vaginal por bacterioscopia por gram (escore de Nugent) medir pH vaginal, dosar D-lactato e L- lactato em mulheres com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL).
- Determinar o tipo de microbiota vaginal por bacterioscopia por gram (escore de Nugent) medir pH vaginal, dosar D-lactato e L- lactato em mulheres com lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL).
- Determinar o tipo de microbiota vaginal por bacterioscopia por gram (escore de Nugent) medir pH vaginal, D-lactato e L- lactato em mulheres com câncer de colo uterino.
- Correlacionar achados citológicos com bacterioscopia de fluido vaginal pH vaginal, D-lactato e L- lactato.
- Correlacionar achados histológicos com bacterioscopia de fluido vaginal pH vaginal, D-lactato e L- lactato.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Tipo de estudo

Trata-se de estudo clínico observacional, transversal, quantitativo e comparativo realizado no Instituto de prevenção do Câncer do Ceará no período de fevereiro a outubro de 2019 para avaliação da microbiota vaginal de mulheres com lesões precursoras de câncer de colo uterino e carcinoma de colo uterino, tendo como controle um grupo de mulheres sem lesões. A pesquisa foi desenvolvida seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, contidas na Resolução de nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Foi submetida ao comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Ceará e aprovada sob o número 2.989.158

6.2. População de estudo

Foram selecionadas aleatoriamente 80 mulheres com idade entre 18 e 69 anos em acompanhamento no Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará (IPC), após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e que foram atendidas no Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará no período de fevereiro/19 a outubro/19.

As pacientes foram distribuídas em 4 grupos de acordo com os diagnósticos de LSIL, HSIL, câncer de colo uterino e ausência de lesões sendo levado em consideração o laudo histopatológico de maior gravidade, quando havia diagnóstico discordante entre a biópsia e a peça de conização.

6.3. Locais de estudo

As amostras foram colhidas no Ambulatório de Patologia Cervical e Colposcopia do Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará sendo, posteriormente, processadas, armazenadas e testadas no Laboratório Professor Eleutério da Costa.

6.4 Critérios de inclusão grupo de estudo

Mulheres com mais de 18 anos e menos de 69 anos não grávidas encaminhadas para colposcopia e que apresentaram diagnóstico histológico de lesão intraepitelial escamosa (de baixo e alto grau) ou câncer de colo uterino

6.5 Critérios de inclusão grupo controle

Mulheres com mais de 18 anos e menos de 69 anos não grávidas com resultados de colposcopias normais ou biópsias negativas

6.6 Critérios de exclusão

Mulheres com menos de 18 anos, gestantes, mulheres que não desejarem participar do estudo, uso de cremes vaginais há menos de 7 dias, sangramento ativo no momento da coleta, última relação sexual há menos de 24 horas.

6.7 Cálculo do tamanho da amostra

O Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará é uma unidade secundária de saúde de referência para o diagnóstico e tratamento de lesões precursoras do câncer de colo uterino no estado do Ceará. Desta forma, nossa amostra foi determinada pelo número de pacientes atendidas na unidade durante o período do estudo e representa bem a população de mulheres de nosso estado.

6.8 Método

6.8.1 Coleta de material

Previamente aos procedimentos biópsia ou conização de pacientes apresentando lesões de colo uterino que foram rastreadas por citologia e encaminhadas para colposcopia foram realizados na seguinte ordem:

- 1) Medido pH em parede vaginal lateral esquerda através de fita indicadora posicionada em contato direto com a mucosa vaginal;

- 2) Colhido swab de parede vaginal lateral direita para confecção de lâmina seca para bacterioscopia por Gram
- 3) Colhido Swab de parede vaginal lateral direita sendo o material depositado em tubo plástico contendo 1 ml de PBS para posterior dosagem de lactato

O material coletado nos tubos plásticos cônicos Eppendorfs® foi a seguir transportado em até 5h, em recipiente refrigerado, ao laboratório Laboratório Prof. Eleutério da Costa onde foi centrifugado por 5 minutos na rotação de 1500 rpm e retirado o sobrenadante que foi armazenado em freezer -20°C.

6.8.2 Bacterioscopia

As lâminas foram coradas utilizando a técnica de Gram e posteriormente analisadas segundo os critérios de Nugent e caracterização de morfotipos.

Todas as amostras foram identificadas por um número e a leitura das lâminas realizada sem conhecimento das informações clínicas das mulheres.

6.8.3 Medida de pH

A medida de pH foi efetuada utilizando-se fita indicadora pH-fix 0-14 macherey-nagel que foi posicionada em contato com a mucosa vaginal das pacientes.

6.8.4 Dosagem de D e L-lactato

Para dosagem de D e L-lactato utilizamos o kit ELISA Sigma-Aldrich Brasil D-Lactate Colorimetric Assay ® e L-Lactate Colorimetric Assay ®

6.8.4.1 D- lactato

Procedimento

Todas as amostras foram trabalhadas em duplicata.

Para obter os padrões para detecção colorimétrica de D-lactato foi diluído 10 µL de 100 mM do lactato padrão em 990 µL do tampão D-lactato para preparar 1mM da solução padrão. Adicionamos 0, 2, 4, 6, 8, 10 µL de 1 mM da solução padrão em uma placa de 96 poços gerando padrões 0 (branco), 2, 4, 6, 8 e 10 nmol/poço. Adicionamos tampão D-lactato em cada poço para atingir um volume de 50 µL.

Preparo da amostra

O ensaio colorimétrico requer 50 µL de amostra para cada reação (poço)

Centrifugamos as amostras em 10,000xg por 10 minutos para remoção do material insolúvel. Adicionamos 1-50 µL da amostra nos poços e adicionamos tampão D-lactato em cada poço para atingir um volume de 50 µL

Reação

Preparamos a solução de reação de acordo com orientações do fabricante.

Adicionamos 50 µL da solução de reação em cada poço, dispusemos a placa em agitador horizontal e incubamos a reação em temperatura ambiente com a placa protegida da luz por 30 minutos.

Medimos a absorbância em 450 nm (A450) em no máximo 4 horas.

Interpretação dos Resultados

Cálculos

A referência para o ensaio é o valor obtido para o padrão 0 D-lactato. Corrigimos os valores subtraindo o valor do poço referência de todas as leituras. Utilizamos os valores obtidos para construir uma curva padrão nas amostras. Usando a medida corrigida, a quantidade de D-lactato presente na amostra pode ser determinada pela curva padrão

Concentração de D-lactato

$$Sa/Sv = C$$

Sa = quantidade de D-lactato em amostra desconhecida (nmole) da curva padrão

S_v = volume da amostra (μL) adicionada nos poços.

C = concentração do D-lactato na amostra

Peso molecular do lactato: 90.08 g/mol

Cálculo da amostra

Quantidade de D-lactato (S_a) = 5.84 nmol

volume da amostra (S_v) = 50 μL

Concentração de D-lactato na amostra

$5.84 \text{ nmol}/50 \mu\text{L} = 0.1168 \text{ nmol}/\mu\text{L}$

$0.101 \text{ nmol/L} \times 90.08 \text{ ng/nmol} = 10.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$

6.8.4.2 L-lactato

Procedimento

Todas as amostras foram trabalhadas em duplicata.

Para obter os padrões para detecção colorimétrica de L-lactato foi diluído 10 μL de 100 mM do lactato padrão em 990 μL do tampão lactato para preparar 1 mM da solução padrão, adicionamos 0, 2, 4, 6, 8, 10 μL de 1 mM da solução padrão em uma placa de 96 poços gerando padrões 0 (branco), 2, 4, 6, 8 e 10 nmol/ poço. Adicionamos tampão lactato em cada poço para atingir um volume de 50 μL .

Preparo da amostra

Ensaio colorimétrico requer 50 μL de amostra para cada reação (poço)

Centrifugamos as amostras em 13,000xg por 10 minutos para remoção do material insolúvel.

Reação

Preparamos a solução de reação de acordo com orientações do fabricante.

Adicionamos 50µL da solução de reação em cada poço, dispusemos a placa em agitador horizontal e incubamos a reação em temperatura ambiente com a placa protegida da luz por 30 minutos.

Medimos a absorbância em 450 nm (A450) em no máximo 4 horas.

Interpretação dos Resultados

Cálculos

A referência para o ensaio é o valor obtido para o padrão 0 lactato. Corrigimos os valores subtraindo o valor do poço referência de todas as leituras. Utilizamos os valores obtidos para construir uma curva padrão nas amostras.

Concentração de L-lactato

$$S_a/S_v = C$$

S_a = quantidade de L-lactato em amostra desconhecida (nmol) da curva padrão

S_v = volume da amostra (mL) adicionada nos poços.

C = concentração do lactato na amostra

Peso molecular do lactato: 89.07 g/mol

Cálculo da amostra

Quantidade de lactato (S_a) = 5.07 nmol

volume da amostra (S_v) = 50 µL

Concentração de lactato na amostra

$$5.07 \text{ nmol}/50 \text{ µL} = 0.101 \text{ nmol}/\text{µL}$$

$$0.101 \text{ nmol}/\text{µL} \cdot 89.07 \text{ ng/nmol} = 9.0 \text{ ng}/\text{µL}$$

6.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico GraphPad Prism® e SPSS®. Para investigar a correlação entre as variáveis analisadas no estudo foi utilizado o teste Exato de Fisher para as variáveis

categóricas; e o teste t de Student e teste de Mann-Whitney para as variáveis contínuas, condicionados à adesão a distribuição normal.

Adotou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

6.8 Aspectos éticos

A todas as pacientes foi feito convite, fornecido termo de consentimento livre e esclarecido e garantida confidencialidade conforme resolução 466/12 do CONEP.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa, da Universidade Federal do Ceará sob o número de parecer consubstanciado: 2.989.158 (ANEXO A)

Recebemos financiamento para aquisição dos kits de dosagem de D e L-lactato.

7. RESULTADOS

A amostra representada por 80 pacientes foi dividida entre os seguintes grupos de acordo com os diagnósticos: mulheres sem lesões intraepiteliais ou negativo (23/ 28,75%), LSIL (10/ 12,5%), HSIL (45/ 56,25%), CEC (2/ 2,5%).

A média de idade do grupo negativo foi de 46,04 anos, no grupo LSIL foi de 41,7 anos, no grupo HSIL foi de 37,95 anos e no grupo CEC foi de 52,5 anos. Entre as pacientes do grupo negativo, 2 (9%) tinham idade <30 anos, 12 (52%) entre 31 e 50 anos e 9 (39%) mais de 50 anos. No grupo de mulheres com diagnóstico de LSIL, 3 (30%) mulheres tinha 30 anos ou menos, 3 (30%) apresentavam idade entre 31 e 50 anos e 4 (40%) tinham mais de 50 anos. Das mulheres com diagnóstico HSIL, 14 (31,1%) tinham 30 anos ou menos, 25 (55,6%) apresentavam idade entre 31 e 50 anos e 6 (13,3%) eram maiores de 50 anos. As pacientes com diagnóstico de câncer foram em número de 2 sendo que uma tinha 36 anos e a segunda 69 anos.

Com relação ao IMC, sobrepeso foi observado em 34,8%; 50% e 44,4 % das mulheres dos grupos negativo, LSIL, e HSIL respectivamente e a obesidade, por sua vez em 34,8%; 20% e 17,8% também nos grupos negativo, LSIL e HSIL.

A nuliparidade foi encontrada em 13% das pacientes do grupo normal, 30% do grupo LSIL, 20% do grupo HSIL e em uma das pacientes com câncer. 34,8% das mulheres do grupo controle, 40% do grupo LSIL e 33,3% do grupo HSIL tinham 3 partos ou mais.

Contracepção hormonal combinada, fator relacionado a maior incidência de câncer de colo uterino foi evidenciada em 13%, 10% e 37,8% das mulheres dos grupos normal, LSIL e HSIL respectivamente.

A menopausa, um fator que pode influenciar reduzindo as concentrações de lactato vaginais, foi constatada em 43,5% das mulheres do grupo negativo, em 40% do grupo LSIL e em 17,8% das pacientes do grupo HSIL. Entre as duas pacientes do grupo CEC, 1 delas se encontrava na menopausa.

O início de atividade sexual em idade precoce com menos de 15 anos foi relatado por 13% e 20% das mulheres dos grupos normal e HSIL e por uma das mulheres do grupo câncer.

A frequência do tabagismo foi baixa em todos os grupos sendo que apenas 2 mulheres do grupo LSIL e 2 mulheres do grupo HSIL relataram história de tabagismo.

A maior parte do grupo norma, 52,2% apresentava como nível de escolaridade o ensino médio completo, no grupo LSIL 30% tinham ensino médio completo e 20% ensino superior, no grupo HSIL por sua vez 26,7% tinham ensino médio completo e 8,9% ensino superior. As duas pacientes do grupo câncer não informaram nível de escolaridade.

Quando observamos a amostra no que se refere aos critérios de Nugent, encontramos 56,5% de microbiota normal no grupo sem lesões intraepiteliais, 50% de microbiota normal no grupo com LSIL e 64,4% de microbiota normal no grupo HSIL. Quando fazemos a comparação entre os grupos negativo + LSIL e HSIL + CEC encontramos um p não significativo de 0,3736. Este dado não está de acordo com a literatura, pois trabalhos evidenciam uma microbiota com maior diversidade em mulheres com lesões intraepiteliais em relação a controles sem lesões. Vaginose bacteriana foi encontrada apenas em 4,3% das mulheres do grupo sem lesões e em 4,4% do grupo HSIL.

A média do pH foi de 4,9 no grupo normal, de 4,6 no grupo LSIL; 5,17 no grupo HSIL e 6 no grupo câncer. Ao comparamos as médias de pH entre os grupos sem alterações + LSIL e os grupos HSIL + CEC, não encontramos uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,1578$).

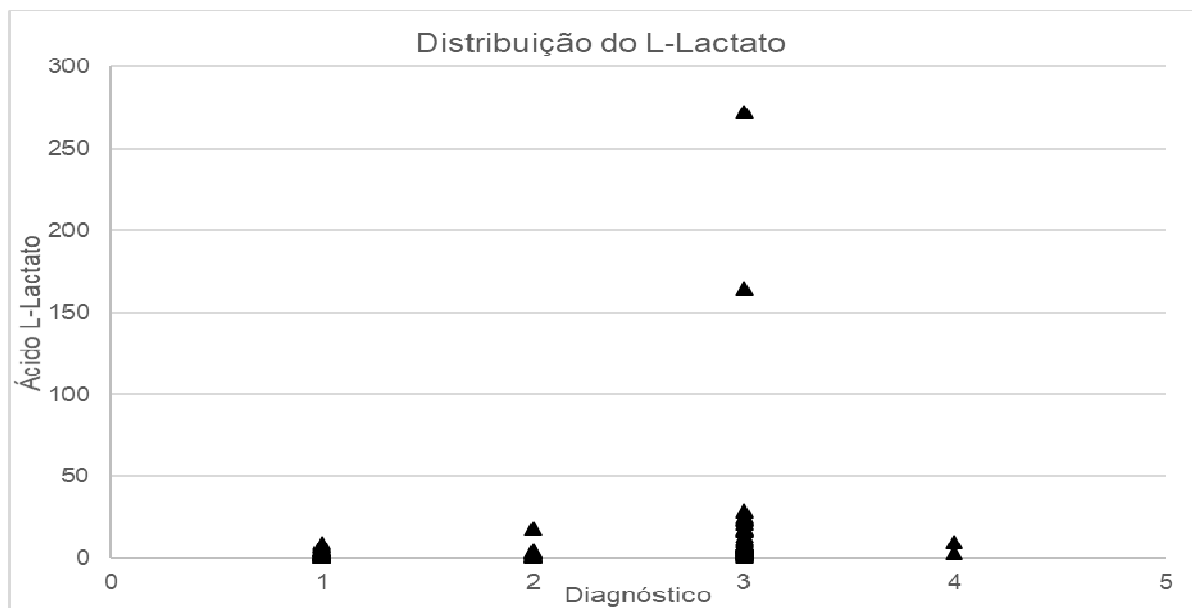
Os valores médios de D-lactato entre os mesmos grupos não apresentaram diferença estatística significativa. Por outro lado, ao analisarmos a diferença nos níveis de L-lactato entre os grupos negativo e HSIL/CÂNCER encontramos uma média de L-lactato no grupo HSIL/câncer de 7,12 e de 3,69 no grupo negativo sendo esta diferença nas concentrações de L-lactato estatisticamente significativa ($p<0,0001$) (tabela 2).

Tabela 1: Características clínicas e demográficas dos pacientes

	Negativo		LSIL		HSIL		Câncer (CEC)	
Faixa etária (n/%)								
≤ 30 anos	2	8,7%	3	30,0%	14	31,1%	0	0,0%
31 -50 anos	12	52,2%	3	30,0%	25	55,6%	1	50,0%
>50 anos	9	39,1%	4	40,0%	6	13,3%	1	50,0%
<i>Total</i>	23		10		45		2	
Índice de Massa Corpórea (IMC)								
Baixo peso (<18,5)	0	0,0%	0	0,0%	1	2,2%	0	0,0%
Normal (18,5 – 24,9)	5	21,7%	1	10,0%	8	17,8%	1	50,0%
Sobrepeso (25 – 29,9)	8	34,8%	5	50,0%	20	44,4%	0	0,0%
Obeso (≥30)	8	34,8%	2	20,0%	8	17,8%	0	0,0%
Não informado	2	8,7%	2	20,0%	8	17,8%	1	50,0%
Número de partos (n/%)								
0	3	13,0%	3	30,0%	9	20,0%	1	50,0%
1	7	30,4%	2	20,0%	9	20,0%	0	0,0%
2	5	21,7%	1	10,0%	1	24,4%	0	0,0%
3	6	26,1%	1	10,0%	6	13,3%	1	50,0%
4	2	8,7%	1	10,0%	1	2,2%	0	0,0%
>4	0	0,0%	1	10,0%	8	17,8%	0	0,0%
Não informado	0	0,0%	1	10,0%	1	2,2%	0	0,0%
Método Anticoncepcional (n/%)								
Contraceção Não Hormonal	9	39,1%	4	40,0%	19	42,2%	1	50,0%
Contraceção Hormonal Isolada	1	4,3%		0,0%	1	2,2%		0,0%
Contraceção Hormonal Combinada	3	13,0%	1	10,0%	17	37,8%		0,0%
N/A	10	43,5%	5	50,0%	8	17,8%	1	50,0%
Menopausa (n/%)								
Não	13	56,5%	6	60,0%	37	82,2%	1	50,0%
Sim	10	43,5%	4	40,0%	8	17,8%	1	50,0%
Início Vida Sexual (n/%)								
<15 anos	3	13,0%	0	0,0%	9	20,0%	1	50,0%
15 - 20 anos	12	52,2%	8	80,0%	33	73,3%	1	50,0%
>20 anos	5	21,7%	1	10,0%	1	2,2%	0	0,0%
Não informado	3	13,0%	1	10,0%	2	4,4%	0	0,0%
Tabagismo (n/%)								
Não	23	100,0%	8	80,0%	43	95,6%	2	100,0%
Sim	0	0,0%	2	20,0%	2	4,4%	0	0,0%
Escolaridade (n/%)								
Analfabeto	0	0,0%	0	0,0%	1	2,2%	0	0,0%
Ensino Fundamental Incompleto	0	0,0%	0	0,0%	5	11,1%	0	0,0%
Ensino Fundamental Completo	1	4,3%	1	10,0%	5	11,1%	0	0,0%
Ensino Médio Incompleto	3	13,0%	3	30,0%	15	33,3%	0	0,0%
Ensino Médio Completo	12	52,2%	3	30,0%	12	26,7%	0	0,0%
Ensino Superior	2	8,7%	2	20,0%	4	8,9%	0	0,0%
Não informado	5	21,7%	1	10,0%	3	6,7%	2	100,0%
PH (n/%)								
4	7	30,4%	3	30,0%	11	24,4%	0	0,0%
5	11	47,8%	6	60,0%	20	44,4%	1	50,0%
6	4	17,4%	0	0,0%	11	24,4%	0	0,0%
7	1	4,3%	0	0,0%	2	4,4%	1	50,0%
9	0	0,0%	0	0,0%	1	2,2%	0	0,0%
Não informado	0	0,0%	1	10,0%	0	0,0%	0	0,0%
NUGENT (n/%)								
Flora Normal (≤3)	13	56,5%	5	50,0%	29	64,4%	0	0,0%
Flora Intermediária (3 – 7)	9	39,1%	5	50,0%	14	31,1%	2	100,0%
Vaginose (≥7)	1	4,3%	0	0,0%	2	4,4%	0	0,0%

Tabela 2: Concentrações de L-lactato e D-lactato

	Diagnóstico	Média ng/ μ L
Ácido L-Lactato	Todos	12,31 (1,51 – 271,92)
	Negativo	4,25 (1,51 – 9,31)
	LSIL	4,72 (1,51 – 18,37)
	HSIL	18,36 (1,51 – 271,92)
	Câncer	6,82 (3,69 – 9,94)
Ácido D-Lactato	Todos	7,23 (0,66 – 29,74)
	Negativo	4,78 (0,66 – 14,66)
	LSIL	6,37 (0,66 – 23,28)
	HSIL	8,89 (0,66 – 29,74)
	Câncer	2,28 (0,66 – 3,89)

Grafico1: L-lactato x diagnósticos**Legenda:**

- 1 Negativo;
- 2 LSIL;
- 3 HSIL
- 4 Câncer.

8. DISCUSSÃO

O câncer cervical consiste em uma causa importante de morbidade e mortalidade por câncer em mulheres ao redor do mundo. Aproximadamente dois terços das pacientes são diagnosticados com doenças localmente avançadas evoluindo com taxas de sobrevida desanimadoras apesar do tratamento adequado (TARQUINA, MANZANO, CASADO, 2018). O equilíbrio da microbiota vaginal pode desempenhar um papel importante na ocorrência e desenvolvimento desse tipo de neoplasia. Por outro lado, o câncer de colo uterino causa uma ruptura das mucosas vaginais e cervicais levando a uma alteração da relação entre microrganismos comensais e patogênicos (KOVACHEV, 2020).

O conceito de microbioma foi sugerido inicialmente em 2001 por Joshua Lederberg quando cunhou o termo microbioma para se referir à comunidade de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos que dividem o mesmo espaço com e formam uma interação complexa com compartimentos humanos teciduais específicos (CURTY, DE CARVALHO, SOARES, 2019).

Os lactobacilos têm sido considerados os guardiões do ecossistema vaginal e de fato são encontrados em quantidade tão elevada que 10.000 a 100 milhões podem ser encontrados por grama de fluido vaginal. Vaginose bacteriana, por outro lado, está associada com um risco aumentado de aquisição de HIV, doença inflamatória pélvica, HPV, infecções pós-operatórias, gonorreia, clamídia e parto prematuro (HAYA *et al.*, 2014).

Os lactobacilos utilizam vários mecanismos para inibir a colonização por patógenos e a capacidade de inibição de microrganismos associados à vaginose bacteriana (*G. vaginalis*, *Bacteroides* spp. e *P. bivia*) se correlaciona com a quantidade de ácido láctico produzido. Acredita-se que a redução do pH seja um dos principais mecanismos inibitórios para a colonização do trato genital por patógenos e o ácido láctico produzido pelos lactobacilos contribui para o valor de pH reduzido (SURBECK, ARVIDSON, 2011).

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a associação entre a microbiota vaginal avaliada pelo score de Nugent, a medida de pH vaginal e a análise de dosagens dos isômeros D e L- lactato presentes no fluido vaginal de mulheres com diagnóstico de LSIL, HSIL, CEC e mulheres sem alterações em colo uterino em um corte transversal incluindo mulheres de 18 a 69 anos.

No grupo controle, em relação ao grupo HSIL, observamos uma elevada proporção de mulheres com mais de 50 anos e conseqüentemente também no período da menopausa. É vastamente reconhecido que o pH vaginal ácido nas mulheres em idade reprodutiva é proporcionado pelo estrogênio, glicogênio e lactobacilos e nas mulheres na menopausa em decorrência da redução dos níveis de estrogênio podemos encontrar uma menor quantidade de lactobacilos e níveis de pH mais elevados. Fato este que pode justificar não termos observado diferença significativa com relação aos níveis de pH entre os grupos.

No entanto, a população microbiana vaginal é muito mais heterogênea do que se acreditava previamente. Espécies como *Bacteroides*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera*, *Leptotrichia* e *Mycoplasma* podem ser encontradas na microbiota vaginal de mulheres saudáveis especialmente em negras e hispânicas. Podendo significar que para manter uma vagina saudável o que realmente importa não é a presença dos lactobacilos, mas, sobretudo, a existência de ácido láctico e de um pH ácido (HAYA *et al.*, 2014).

Cerca de 25% das mulheres mantêm uma microbiota vaginal saudável sem dominância de lactobacilos (AMABEBE, ANUMBA, 2018). Enquanto o pH vaginal indubitavelmente contribui para a manutenção da homeostase vaginal ainda permanece por ser determinado como a saúde vaginal é mantida em adolescentes e mulheres menopausadas que carecem de um número elevado de lactobacilos ou nos 25% de mulheres em idade reprodutiva cujas comunidades vaginais não são dominadas por lactobacilos. Este fato nos afasta da noção excessivamente simplista que lactobacilos são bons porque eles reduzem o pH vaginal e que todas as outras espécies são patógenos oportunistas.

Ravel e colaboradores encontraram que 80 a 90% das comunidades bacterianas vaginais de mulheres asiáticas e brancas eram dominadas por espécies de lactobacilos enquanto que apenas 60% das mulheres hispânicas e afro-americanas portavam microbiomas dominados por lactobacilos. Essa diferença se refletiu em uma média mais elevada de valores de pH ($pH > 4,5$) encontrada em hispânicas e afro-americanas. Este dado pode corroborar com o fato de termos encontrado uma média de pH mais elevada acima de 4,5 em todos os grupos. Diferenças na composição microbiana podem influenciar radicalmente em como

essas comunidades respondem a infecções e outros desequilíbrios (HUANG *et al.*, 2014)

Em virtude da elevada prevalência das lesões intraepiteliais cervicais precursoras e do câncer de colo uterino entre as mulheres brasileiras e da carência de estudos que caracterizem a microbiota vaginal dessa população além da associação entre essas duas condições clínicas, torna-se evidente a importância de mais pesquisas nessa área de conhecimento.

Estudos sugerem associação entre lesões intraepiteliais precursoras do câncer de colo uterino e disbiose (WITKIN *et al.*, 2019). A patogênese da associação entre disbiose e NIC é desconhecida. Foi sugerido que a disbiose pode resultar em dano epitelial que facilitaria a entrada do HPV nas células epiteliais assim como poderia proporcionar um ambiente promotor do ciclo viral, persistência da infecção e finalmente o desenvolvimento da displasia (WITKIN *et al.*, 2019).

Mitra *et al* afirma que a conexão entre saúde doença e a microbiota humana é uma área de pesquisa em crescimento rápido e a apreciação da variação da composição da microbiota entre indivíduos está expandindo nossa compreensão da patofisiologia de uma variedade de doenças afetando os sistemas do organismo desde câncer colorretal a dermatite atópica e que há muito trabalho a ser feito para desvendar a relação sofisticada entre hospedeiro, microbiota e carcinogênese. Mitra *et al* estudaram 169 mulheres na Inglaterra com LSIL, HSIL, câncer invasor e controles normais e mostraram que uma maior gravidade de NIC estava associada com maior diversidade microbiana e redução relativa do número de lactobacilos. No estudo de mitra a prevalência de vaginose no grupo controle foi de 10% consistente com outros estudos em indivíduos sem doenças. Um estudo em mulheres coreanas com SIL identificou que a presença de *Anaerococcus vaginae*, *Gardnerella vaginalis* e *L. iners* na ausência de *L. crispatus* seria a combinação de maior risco para o desenvolvimento de SIL. Uma das limitações das pesquisas em oncobioma é a ausência de dados longitudinais que permitam fazer associação de causalidade. (MITRA *et al.*, 2016).

Entretanto, outros estudos não encontraram uma correlação positiva entre NIC e vaginose bacteriana. Este achado pode ser explicado parcialmente pela falta de testes diagnósticos objetivos, a confiabilidade de sistemas de escores subjetivos para a vaginose bacteriana e a heterogeneidade da própria vaginose bacteriana. Como exemplo podemos citar Piyathilake *et al*, 2016 que não encontraram uma

associação entre diversidade microbiana vaginal elevada e HSIL ao estudarem mulheres com HPV de alto risco com diagnóstico de LSIL ou HSIL. No estudo de Piyathilake et al, 2016 o tipo de microbiota dominada por *L. iners* e *Lactobacillus* não classificados apresentaram maior incidência de HSIL quando comparado com o grupo portando *Lactobacillus* não classificados, *L. iners*, *Bifidobacteriaceae*, *Clostridiales* e *Allobaculum*.

Em nossa amostra, encontramos no grupo negativo uma incidência de vaginose de cerca de 4,3%, um número abaixo do esperado nessa população que seria de 10% e um valor semelhante (4,4%) no grupo HSIL, não havendo, portanto, diferença significativamente estatística no que se refere à microbiota vaginal pois esperávamos encontrar microbiota heterogênea e com menor quantidade de lactobacilos nesse último grupo.

Em nosso estudo evidenciamos uma elevada proporção de mulheres com microbiota considerada normal de acordo com os critérios de Nugent e seria esperado devido a este fato médias de pH menores do que as encontradas. Em nossa pesquisa não tivemos como objetivo determinar as espécies de lactobacilos presentes em cada grupo, mas uma hipótese que justificaria o achado de microbiota normal e pH acima de 4,5 seria uma maior presença da espécie *L. iners*. Uma microbiota dominada por *L. iners* está usualmente associada à disbiose e parece menos estável e mais suscetível a transição para vaginose. (HUANG *et al.*, 2014; AMABEBE, ANUMBA, 2018,). O gene codificador da D-lactato desidrogenase está completamente ausente no genoma do *L. iners* corroborando a evidencia de que ele não é capaz de produzir D-lactato (WITKIN *et al.*, 2013). Isso sugere que dependendo da espécie de lactobacilos dominante, diferentes concentrações de D e L-lactato podem estar presentes no ambiente vaginal (WITKIN *et al.*, 2013).

Os *lactobacilos* diferem na produção de ácido láctico uma vez que a abundância de ácido láctico não parece se correlacionar com a abundância de uma espécie de lactobacilos específica (ALDUNATE *et al.*, 2015).

Lactato inibe a atividade da histona-deacetilase (enzima capaz de remover grupos acetil em uma histona, permitindo às histonas a capacidade de enrolar o DNA) e promove mudanças na expressão gênica aumentando a transcrição gênica podendo ser o lactato um importante regulador transcricional ligando o estado metabólico da célula com a transcrição. D-lactato promove maior proteção contra disbiose que o L-lactato. Seus níveis são mais elevados quando *L. crispatus* é a

espécie dominante e mais baixo quando *L. iners*, *Gardnerella* ou *Streptococcus* predominam (AMABEBE, ANUMBA, 2018). Hearps et al demonstrou efeito anti-inflamatório do L-lactato assim como inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais cervicovaginais e contribuiu para a avaliação de que a habilidade do L-LA em inibir fatores inflamatórios associados à transmissão do vírus HIV inclusive quando na presença de uma microbiota vaginal complexa sugere que esse metabólito pode ser um importante condutor do efeito protetor da microbiota vaginal dominada por lactobacilos contra a transmissão do HIV observada in vivo (DELGADO-DIAZ *et al.*, 2020). Aldunate *et al.*, (2015) encontrou que o L-lactato a 0,3% mostrou maior atividade virucida que D e DL-lactato.

Uma maior relação entre L e D-lactato pode levar a uma maior expressão do indutor de metaloproteinase de matriz extracelular (EMMPRIN) e ativação da metaloproteinase (MMP-) 8. Essa expressão pode levar a perda da integridade cervical e facilitar a entrada do HPV nos queratinócitos basais (MITRA *et al.*, 2016).

Propriedades imunomoduladoras têm sido relacionadas ao L-lactato. Estudo no campo do câncer demonstraram que o L-lactato produzido pelas células tumorais gera um microambiente levemente ácido que promove a sobrevivência tumoral e metástase mediando efeitos imunossupressivos diretos através da redução da função celular da célula T citotóxica, função monocitária, maturação celular dendrítica e produção de citocinas pelas células imunes (ALDUNATE *et al.*, 2015)

A composição da microbiota cervicovaginal é dinâmica mudando de acordo com as flutuações hormonais, uso de contraceptivos orais, atividade sexual, lactação, diabetes mellitus e stress. Apesar de que existem muitos estudos sobre o microbioma cervico vaginal e sua associação com infecções virais, pouco se sabe sobre o papel do microbioma na carcinogênese, nos mecanismos responsáveis pela eliminação do hrHPV ou infecção persistente (CURTY, DE CARVALHO, SOARES, 2019).

Alguns estudos correlacionam o tipo de microbiota vaginal com a presença ou ausência do vírus HPV, mas não encontramos trabalhos associando os níveis de lactato com as lesões intraepiteliais.

Talvez a concentração dos isômeros do lactato seja mais importante que a presença de lactobacilos no processo saúde-doença do trato genital feminino, pois os lactobacilos não são os únicos produtores de ácido láctico e existem vaginas

saudáveis caracterizadas pela presença de outras bactérias que não os lactobacilos. Em nossa pesquisa não determinamos os morfotipos presentes e nem as espécies de lactobacilos encontradas em cada grupo de estudo e a presença de diferentes espécies de lactobacilos na composição da microbiota vaginal e que produzem ácido láctico em quantidades diferentes pode justificar os dados discordantes em relação à literatura.

Em nosso estudo não conseguimos demonstrar diferenças nos níveis de D-lactato entre os grupos estudados, contudo encontramos valores estatisticamente significantes ($p < 0,0001$) evidenciando níveis mais elevados de L-lactato no grupo HSIL + CEC quando comparado ao grupo controle. Nossos dados corroboram o conceito de Witkin no que diz respeito à correlação entre microbioma, ácido láctico e carcinogênese. Ele afirma que a produção de ácido láctico facilita a sobrevivência das células malignas, inibe a ativação das células imunes e a liberação de mediadores inflamatórios em resposta a antígenos tumorais específicos. Portanto, as mesmas propriedades redutoras de estresse atribuídas ao ácido láctico que promovem a saúde do trato genital inferior feminino facilitam a transformação e progressão maligna. Explica ainda que uma característica comum das células malignas é a produção de elevados níveis de ácido láctico mesmo em condições aeróbicas (efeito Warburg ou glicólise aeróbica) e que o ácido láctico produzido é liberado das células e reduz o pH do meio extracelular favorecendo a evasão do sistema imune e progressão tumoral. Já foi demonstrado que a inibição da desidrogenase láctica reduz a função das células tumorais. O autor conclui que, portanto, a acidificação do ambiente extracelular pelo ácido láctico é uma característica compartilhada pelos tumores em desenvolvimento e pela vagina humana e que a produção e liberação do ácido láctico no microambiente tumoral auxilia na sobrevivência da célula tumoral através de vários mecanismos. A redução do pH nas regiões adjacentes ao tumor dificulta a resposta imune antitumoral, a atividade dos linfócitos T citotóxicos é reduzida, a secreção dos mediadores pro-inflamatórios é bloqueada e a maturação das células dendríticas é inibida. Foi demonstrado que o ácido láctico estimula a liberação de interleucina-17 pelos macrófagos em cenário de malignidade. O aumento seletivo dos linfócitos Th17 e liberação de interleucina-23 inibe a toxicidade e migração das células T CD8 e aumenta o desenvolvimento da célula tumoral. Entretanto, a contribuição do ácido láctico na manutenção do bem estar vaginal é específica de humanos. A adaptação do mecanismo baseado no ácido láctico para a

promoção da saúde reprodutiva e sua persistência através das gerações é, por conseguinte, uma ocorrência relativamente recente que provavelmente surgiu como uma resposta efetiva para a fisiologia única, comportamentos e ambiente da espécie humana (WITKIN, 2018)

Para manter uma vagina saudável o que realmente importa não é a presença de lactobacilos, mas sim a existência de ácido lático e de um pH ácido (HAYA *et al.*, 2014)

Aldunate *et al.*, (2013) em seu artigo afirma que vários ensaios clínicos avaliaram o uso de probióticos para o tratamento de vaginose bacteriana, entretanto apesar de aparentemente essa aplicação do uso dos lactobacilos ser promissora, os dados são inconclusivos. Avalia ainda que o uso de diferentes lactobacilos produtores de ácido lático em quantidades diferentes ou outros fatores que dificultem a manutenção da colonização por estas linhagens pode explicar os dados discordantes. E propõe o uso do ácido lático ao invés dos probióticos como uma estratégia alternativa de tratamento. Nesse contexto, nossa pesquisa encontrou uma maior concentração de L-lactato em casos de lesões de colo uterino HSIL/CEC, fato que pode orientar no sentido do uso preferencial da molécula D-lactato objetivando a promoção da saúde genital feminina.

Através da influência dos níveis relativos de D e L-lactato que determinam a taxa de liberação de mediadores das células do hospedeiro, a composição do microbioma vaginal pode desempenhar um papel maior do que o esperado na patofisiologia das desordens do trato genital feminino. A manipulação das concentrações vaginalis dos isômeros do ácido lático pode se tornar um novo método de prevenção e tratamento desses problemas (BEGHINI *et al.*, 2015). E contribuir, deste modo, para o desenvolvimento de medicamentos relevantes para a manutenção da saúde genital feminina.

Em uma população com números elevados de casos de câncer de colo uterino com necessidade de melhor rastreio e com objetivo de tratamento das lesões precursoras visando à erradicação do câncer cervical, poderia ter boa aplicabilidade do L-lactato como um biomarcador de risco para a presença de lesão Intraepitelial cervical de alto grau facilitando o rastreio dessas lesões em sinergia com o uso da citologia oncológica, pois a identificação de pacientes que estão mais suscetíveis a desenvolver uma lesão cervical de alto grau ou lesão cancerosa é um dos maiores desafios da colposcopia atual. Preocupações com os elevados custos de rastreio

acurácia limitada da citologia e complicações de tratamento desnecessário impulsionaram pesquisa e desenvolvimento de abordagens mais eficientes para a prevenção do câncer cervical. Novos biomarcadores podem ter uso potencial como testes de triagem para citologia de rastreamento e como testes de triagem para rastreamento primário com pesquisa de HPV. Para um marcador ser considerado útil o teste deve influenciar o manejo clínico, cujas opções incluem encaminhamento direto para tratamento, encaminhamento para colposcopia para confirmação histológica maior atenção no seguimento com acompanhamento mais rigoroso ou liberação para rastreamento de rotina. Uma área importante de pesquisa seria a identificação de lesões cervicais mais propensas à progressão para câncer. Os limiares de risco e disponibilidade de recursos podem variar substancialmente entre as populações e levar a diferentes recomendações de rastreamento baseados em níveis ideais de risco e benefício (SAHASRABUDDLE, LUHN, WENTZENSEN, 2011).

Apesar de que pesquisas recentes esclareceram a dinâmica comensal-hospedeiro no trato gastrointestinal e, em certa extensão no microbioma vaginal, em relação a complicações da gravidez e na doença inflamatória pélvica, muito menos se conhece a respeito do microbioma cervical em relação ao risco de câncer cervical. Essa lacuna precisa ser preenchida se quisermos explorar o potencial de intervenções baseadas na microbiota para prevenir o câncer cervical (PIYATHILAKE *et al.*, 2016).

Podemos citar como limitações do estudo o fato de ser um estudo de corte transversal não permitindo-nos avaliar causa e efeito, mas tão somente fazer associações entre as variáveis estudadas além de que as analisamos em um único momento permitindo apenas um vislumbre dos dados naquele instante específico.

9. CONCLUSÕES

- Não observamos diferenças significativamente estatísticas no que se refere à microbiota vaginal entre os grupos negativo, LSIL, HSIL e câncer.
- Não observamos diferenças significativamente estatísticas no que se refere ao pH entre os grupos negativo, LSIL, HSIL e câncer
- Não observamos diferenças significativamente estatísticas no que se refere a quantidade de D-lactato presente no fluido vaginal entre os grupos negativo, LSIL, HSIL e câncer
- Observamos diferença significativamente estatística no que se refere à quantidade de L-lactato presente no fluido vaginal entre os grupos negativo e HSIL + câncer.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de colo uterino apesar de ser uma doença evitável é um grave problema de saúde pública brasileiro com elevada mortalidade e consequências danosas para a saúde reprodutiva e qualidade de vida das mulheres vítimas dessa doença. O controle do câncer de colo uterino representa um grande desafio. A prevenção com a vacinação, o rastreamento com técnicas de biologia molecular e o tratamento das lesões precursoras são medidas importantes nesse sentido. Contudo, em virtude da elevada prevalência, da dificuldade de rastreamento em um país de dimensões continentais e da escassez de recursos, a pesquisa em busca de conhecimento e o desenvolvimento de novas técnicas que auxiliem na seleção das mulheres em maior risco de desenvolvimento de câncer incluindo a avaliação do microbioma vaginal pode desempenhar um papel crucial para que se alcance o almejado controle do câncer de colo uterino na população feminina brasileira.

REFERÊNCIAS

- ALDUNATE, M.; SRBINOSVSKI, D.; HEARPS, AC. *et al.* Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front Physiol.* v. 2, n. 6, p. 164, 2015.
- ALDUNATE, M.; TYSSSEN, D.; JOHNSON. *et al.* Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV. *J Antimicrob Chemother.* v. 68, n. 9, p. 2015-2025, 2013.
- AMABEBE, E.; ANUMBA, DOC. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of *Lactobacilli*. *Front Med (Lausanne)*. v. 13, n. 5, p. 181, 2018.
- AUDIRAC-CHALIFOUR, A.; TORRES-POVEDA, K.; BAHEBA-ROMÁN. *et al.* Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS One.* v. 11, n. 4, p. e0153274, 2016.
- BEGHINI, J.; GIRALDO, P. C.; ELEUTÉRIO JR, J. *et al.* Vaginal Inflammation: Association Between Leukocyte Concentration And Immune Mediators Levels. *Am J Reprod Immunol.* 2016 Feb;75(2):126-33.
- BEGHINI, J.; LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C. *et al.* Differential expression of lactic acid isomers, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and matrix metalloproteinase-8 in vaginal fluid from women with vaginal disorders. *BJOG.* v. 122, n. 12, p.1580-5, Nov., 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.394, de 30 de dezembro de 2013. **Sistema de Informação de Câncer (SISCAN) no âmbito do Sistema único de Saúde (SUS)**, 2013.
- BROTMAN, R. M.; SHARDELL, M. D.; GAJER, P. *et al.* Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *J Infect Dis.*, v. 210, n. 11, p.1723-1733, Dec., 2014.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Trends in Human Papillomavirus - Associated Cancers - United States**, 1999–2015. v 67, n. 33, p. 918–924, 2018.
- CHAMPER, M.; WONG, A. M.; CHAMPER, J. *et al.* The role of the vaginal microbiome in gynaecological cancer. *BJOG*, v. 125, n. 3, p. 309-315, Feb., 2018.
- CONE, R. A. Vaginal Microbiota and Sexually Transmitted Infections That May Influence Transmission of Cell-Associated. *J Infect Dis.*; v. 210, n. 3, 616–621 Dec., 2014
- CROSBIE, E. J.; EINSTEIN, M. H.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* v. 382, n. 9895, p. 889-99, Sep., 2013.
- CURTY, G.; DE CARVALHO, OS.; SOARES, MA. The Role of the Cervicovaginal Microbiome on the Genesis and as a Biomarker of Premalignant Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Cancer. *Int J Mol Sci.* v. 21, n. 1, p. 222, 2019.

- D'ALESSANDRO P.; ARDUINO, B.; BORGIO M. *et al.* Loop Electrosurgical Excision Procedure versus Cryotherapy in the Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Gynecol Minim Invasive Ther.**, v. 7 n. 4, p. 145-151, Oct-Dec., 2018.
- DE CASTRO-SOBRINHO, J. M.; RABELO-SANTOS, S. H.; FUGUEIREDO-ALVES, R. R. *et al.* Bacterial Vaginosis and Inflammatory Response Showed Association with severity of Cervical Neoplasia in HPV-Positive Women. **Diagn Cytopathol.**, v. 44, n. 2, p. 80-6, Feb., 2016.
- DELGADO-DIAZ, DJ.; TYSSSEN, D.; HAYWARD, JA. *et al.* Distinct Immune Responses Elicited From Cervicovaginal Epithelial Cells by Lactic Acid and Short Chain Fatty Acids Associated With Optimal and Non-optimal Vaginal Microbiota. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 9, n. 446, p. 1-13, 2020.
- DING, M.; ZHANG, H.; LIU, L. Effect of NOS1 regulating ABCG2 expression on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells. **Oncol Lett.**, v. 17, n. 2, p. 1531-1536, Feb., 2019.
- DOORBAR J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol.**, v. 32, n. 1, 7-15, Mar., 2005
- FISHER, J. W.; BRUNDAGE, S. The Challenge of Eliminating Cervical Cancer in the United States: A Story of Politics, Prudishness, and Prevention. **Women & Health**, v. 49, n. 2-3, p. 246-261, jun., 2009.
- FONTHAM, ETH.; WOLF, AMD.; CHURCH, TR. *et al.* Cervical Cancer Screening for Individuals at Average Risk: 2020 Guideline Update from the American Cancer Society. **A Cancer Journal for Clinicians Early View**. v. 1, n. 1, p. 1-26, 2020.
- GAO, W.; WENG, J.; GAO, Y. *et al.* Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. **BMC Infect Dis.**, v. 13, p. 271, Jun, 2013.
- GUAN, P.; HOWELL-JONES, R.; LI, N. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. **Int J Cancer.**, v. 131, n. 10, p. 2349-5, Nov, 2012.
- GUO, Y. L.; YOU, K.; QIAO, J. *et al.* Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. **Int J STD AIDS.**, v. 23, n. 8, p. 581-4, Aug., 2012:581-5845.
- HANS-ULRICH, B.; ROBERT, D. B.; ZIGUI C. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. **Virology.**, v.401, n. 1, p. 70-79, May., 2010
- HAYA, J.; GARCIA, A.; LÓPEZ-MANZANARA, C. *et al.* Importance of Lactic Acid in Maintaining Vaginal Health: A Review of Vaginitis and Vaginosis Etiopathogenic Bases and a Proposal for a New Treatment. **Open Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 4, n. 13, p. 787-799, 2014.
- HERFS, M.; YAMAMOTO, Y.; LAURY, A. *et al.* A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **PNAS**. v. 109, n. 26, p. 10516-10521, 2012.

HONGWEI, Z.; JIAQI, L.; YINGYING, L. *et al.* Cervical microbiome is altered in cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure in china. **Sci Rep.**, v. 8, p. 4923, Mar., 2018.

HUANG, B.; FETTWEIS, JM.; BROOKS, JP. *et al.* The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome). **Clin Lab Med.**, v. 34, n. 4, p. 747-61, 2014.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Conceito e Magnitude. Disponível em <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/conceito-e-magnitude> Acessado 15/07/2019.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: **Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/> Acessado 21/5/2019.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.

JR MAYEAUX, E. J.; COX, J. T. **Tratado e Atlas Colposcopia Moderna**, 3ª Edição, Editora Dilivros. 2014.

KERO, K.; RAUTAVA, J. HPV Infections in Heterosexual Couples: Mechanisms and Covariates of Virus Transmission. **Acta Cytol.**, v. 63, n. 2, p. 143-147, 2019.

KERO, K.; RAUTAVA, J.; SYRJÄNEN, K. Association of asymptomatic bacterial vaginosis with persistence of female genital human papillomavirus infection. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 36, n. 11, p. 2215-2219, Nov., 2017.

KING, C. C.; JAMIESON, D. J.; WIENER, J. *et al.* Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. **Infect Dis Obstet Gynecol.**, v. 2011. p. 1-8, 2011.

KOVACHEV, SM. Cervical cancer and vaginal microbiota changes. **Arch Microbiol.** v.202 n. 2, p. 323-327, 2020.

LEE, J. E.; LEE, S.; LEE, H. *et al.* Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63514, May., 2013.

LEHTOVIRTA, P.; PAAVONEN, J.; HEIKINHEIMO, O. Risk factors, diagnosis and prognosis of cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. **Int J STD AIDS.**, v. 19, n. 1, p. 37-41, Jan., 2008.

LINHARES, I. A.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E. C. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56, n.3, p.370-374, 2010.

MITRA, A.; MACLNTYRE, DA.; MARCHESI, JR. *et al.* vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next?. **Microbiome**. v. 4, p. 58, 2016.

MOSSOP, H.; LINHARES, I. M.; BONGIOVANNI, A. M. *et al.* Influence of lactic acid on endogenous and viral RNA-induced immune mediator production by vaginal epithelial cells. **Obstet Gynecol.**, v. 118, n. 4, p. 840-6, 2011.

- MOTEVASELI, E.; SHIRZAD, M.; AKRAMI, S. M. *et al.* Normal and tumor cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. **J Med Microbiol.**, v. 62, n. 7, p. 1065-1072, Jul., 2012.
- MUNOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZÁLES, A. B. *et al.* Chapter 1: HPV in the etiology of human câncer. **Vaccine.** v. 31, n. 24p. 1-10, Ago., 2006.
- NASIOUDIS, D.; LINHARES, I. M.; LEDGER, W.J. Bacterial vaginosis: a critical analysis of current knowledge., v. 124, n. 1, p. 61-6. **BJOG.** Jan., 2017.
- NAUD, PSV.; HAMMES, LS.; MATOS, JC. *et al.* História da colposcopia: do invento de Hinselmann aos ensaios clínicos atuais. **Femina.** v. 34, n. 9, p. 597-605, 2006.
- NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. **J Clin Microbiol.**, v. 29, n. 2, p. 297-301, Feb., 1991.
- PIYATHILAKE, C.J.; OLLBERDING, N.J.; KUMAR, R. *et al.* Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses. **Cancer Prev Res (Phila).** v. 9, n. 5, p. 357-66, 2016.
- RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z. *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 108, n. 1, p. 4680–4687, 2011.
- SAHASRABUDDLE, VV.; LUHN, P.; WENTZENSEN. Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. **Future Microbiol.** v. 6, n. 9, p. 1-25, 2011.
- SELLORS, JW.; SANKARANARAYANAN R. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: Manual para principiantes.** 2004. Acesso em 30 ago 2020. Disponível em: <https://screening.iarc.fr/colpocopyright.php?lang=4>
- SHANNON, B.; YI, T. J.; PERUSINI, S. *et al.* Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. **Mucosal Immunol.**, v. 10, n. 5, p. 1310-1319, Sep., 2017.
- SHANNON, B.; YI, T.J.; PERUSINI, S. *et al.*, 2017. Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. **Mucosal Immunol.**, v. 10, n. 3, p. 1310-1319, 2017.
- SNIJDERS, P. J.; STEENBERGEN, R. D.; HEIDEMAN, D. A. *et al.* HPV-mediated cervical carcinogenesis: Concepts and clinical implications. **J Pathol.**, v. 2008, n. 2, p. 152-164, Jan., 2006.
- SOWJANYA, A. P.; RAO, M.; VEDANTHAM H. *et al.* Correlation of plasma nitrite/nitrate levels and inducible nitric oxide gene expression among women with cervical abnormalities and câncer. **Nitric Oxide.**, v. 30, n. 52, p. 21-82, Jan., 2016.
- SPURBECK, RR.; ARVIDSON, CG. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. **Future Microbiol.** v. 6, n. 5, p. 567-82, 2011.
- TARQUINA, G.; MANZANO, A.; CASADO, A. Targeted Agents in Cervical Cancer: Beyond Bevacizumab. **Curr Oncol Rep.** v. 20, n 5, p. 40, 2018.

THULER, L. C. S. Câncer do Colo do Útero no Brasil: Estado da Arte. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 3, p. 321-337, 2012.

VAN DE WIJGERT J. H.; BORGDORFF, H.; VERHELST, R. *et al.* The Vaginal Microbiota: What Have We Learned after a Decade of Molecular Characterization? **PLoS One.**, v.9, n. (8), p.e105998, Aug., 2014.

VAN DOORSLAER, K.; CHEN, Z.; BERNARD, H. U. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Pa pillomaviridae. **J. Gen. Virol.**, v. 99, n. 8, p. 989-990, Aug., 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Atlas**, 2017. Disponível em <https://screening.iarc.fr/pic/00004804.jpg> Acessado em 15/07/2019.

WHO. World Health Organization. **Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice - Second edition. 2014.** Acesso em 05 ago 2020. Disponível em <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/cancers/cervical-cancer-guide/en/>

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012.** Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/> Acessado 15/07/2019.

WIJK, J.; SENGPIEL, V.; KYRGIU, M. *et al.* Cervical microbiota in women with cervical intra-epithelial neoplasia, prior to and after local excisional treatment, a Norwegian cohort study, Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A pilot Study. **BMC Womens Health**. v. 19, p. 30, 2019.

WITKIN, SS. Lactic acid alleviates stress: good for female genital tract homeostasis, bad for protection against malignancy. **Cell Stress Chaperones**. v. 23, n. 3, p. 297-302, 2018.

WITKIN, SS.; MENDES-SOARES, H.; LINHARES, IM. *et al.* Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. **mBio**. v. 6, n. 4, p. e00460-13, 2013.

YU, L.; SUN, B.; LIU, X. *et al.* Nitric oxide inhibits the transcription of E6 gene of human papillomavirus. **Acta**, v. 62, n. 4, p. 447-453, 2018.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta**, v. 1288, n. 2, p. F55-78, Oct., 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p.342-5, May., 2002.

ZUR HAUSEN, H.; BARRÉ-SINO, F.; MONTAGNIER, L. Human papilloma viruses causing cervical câncer. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine**, p. 1-11, 2008.

APÊNDICE – A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Prezada senhora,

Você está sendo convidada por mim, Christina Cordeiro Benevides de Magalhães, médica e servidora do Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará, mestranda do departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará, a participar, voluntariamente, da pesquisa intitulada **ESTUDO DA MICROBIOTA VAGINAL POR GRAM, pH, E NÍVEIS DE LACTATO VAGINAIS EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E CÂNCER DE COLO UTERINO**. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Esta pesquisa pretende avaliar as bactérias presentes na vagina de pacientes que tenham manchas no colo uterino causadas pelo vírus do HPV. Sua participação consiste em permitir que seja coletado, durante o exame ginecológico que já será realizado para o seu tratamento, uma pequena quantidade da secreção vaginal com uma espátula de madeira. Esse material será transferido para uma lâmina que será depois examinada em um microscópio e dessa forma veremos que tipos de bactéria estão presentes na vagina em cada caso. O exame não interfere no tratamento, não causa dor nem desconforto.

Você poderá desistir de participar, a qualquer momento, sem qualquer prejuízo do seu atendimento médico. Os dados e material coletado serão utilizados exclusivamente para esta pesquisa que é voluntária. Os dados e resultados da pesquisa não permitem a identificação dos participantes exceto pelo pesquisador e as informações serão divulgadas apenas entre os profissionais estudiosos do assunto.

Somente depois de devidamente esclarecida e de ter entendido o que foi explicado deverá assinar este documento caracterizando a sua autorização para participar da pesquisa.

Endereço do responsável pela pesquisa:

NOME: Christina Cordeiro Benevides de Magalhães

INSTITUIÇÃO: Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará

ENDEREÇO: Rua Walter Bezerra de Sá, 58

TELEFONES PARA CONTATO: 3101-1458/3101-7912

ATENÇÃO: Se você tiver alguma dúvida ou consideração sobre sua participação na pesquisa entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (horário: 08:00-12:00 de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, _____ anos RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

_____	____/____/____	_____
Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
_____	____/____/____	_____
Nome do pesquisador	Data	Assinatura
_____	____/____/____	_____
Nome da testemunha (caso voluntário)	Data	Assinatura
_____	____/____/____	_____
Nome do profissional que aplicou	Data	Assinatura

APÊNDICE – B – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS**ESTUDO DA MICROBIOTA VAGINAL POR GRAM, pH, E NÍVEIS DE LACTATO VAGINAIS EM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E CÂNCER DE COLO UTERINO**

NOME: _____
PRONTUÁRIO: _____
DIAGNÓSTICO: _____
DATA NASCIMENTO: ___/___/___ IDADE: _____ ESCOLARIDADE: _____
PESO: _____ ALTURA: _____
G ___ P ___ A ___ IVS: _____
UR: ___/___/___
MAC: _____
TABAGISMO: SIM NÃO
ÚLTIMA RELAÇÃO SEXUAL: +48HS -48H

ANEXO A - PARECER CEP

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto em questão está muito bem escrito, de boa leitura e entendimento. Está incluído desenho do estudo, introdução, revisão, objetivos, metodologia, cronograma de atividades, orçamento e outros. A documentação exigida pela RESOLUÇÃO 466/2012/CNS/MS que regulamenta os estudos aplicados aos seres humanos está incluída.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação do trabalho estão coerentes com o tema abordado e o rigor da ética em pesquisa.

Recomendações:

O projeto de pesquisa está devidamente instruído para que o mesmo seja executado. Portanto o parecer é favorável à sua APROVAÇÃO. Incluir o resumo na versão final do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1109940.pdf	09/09/2018 20:16:49		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MESTRADOMICROBIOTA_HPV.docx	09/09/2018 20:16:05	CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHAES	Aceito
Cronograma	CRONOGRAM1.docx	09/09/2018 20:15:45	CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHAES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODECONSENTIMENTOLIVREEE SCLARECIDO.docx	08/08/2018 22:57:21	CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHAES	Aceito
Outros	Dados.pdf	08/08/2018 22:54:52	CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHAES	Aceito
Outros	Apreciacao.pdf	08/08/2018 22:54:09	CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHAES	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	08/08/2018 22:51:27	CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHAES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Concordancia.pdf	08/08/2018 22:50:04	CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHAES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia.pdf	08/08/2018 22:49:44	CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHAES	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	08/08/2018 22:47:26	CHRISTINA CORDEIRO BENEVIDES DE MAGALHAES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado