



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Rafael Belleti

**Quantificação cérvico-vaginal do gene codificante
da sialidase de *Gardnerella vaginalis* e correlação
com a taxa de *clearance* do Papilomavírus Humano
em mulheres imunocompetentes.**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências - área Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Marconi
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Dra. Larissa Doddi Marcolino

**Botucatu
2020**

Rafael Belleti

Quantificação cérvico-vaginal do gene codificante da sialidase de *Gardnerella vaginalis* e correlação com a taxa de *clearance* do Papilomavírus Humano em mulheres imunocompetentes.

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre
em Ciências - área Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Marconi
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Dra. Larissa Doddi Marcolino

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Belleti, Rafael.

Quantificação cérvico-vaginal do gene codificante da sialidase de *Gardnerella vaginalis* e correlação com a taxa de clearance do papilomavírus humano em mulheres imunocompetentes / Rafael Belleti. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Camila Marconi
Coorientador: Márcia Guimarães da Silva
Coorientador: Larissa Doddi Marcolino
Capes: 40103005

1. Papillomaviridae. 2. Neuraminidase. 3. *Gardnerella vaginalis*. 4. Estudos de coortes.

Palavras-chave: Clearance; *Gardnerella vaginalis*; HPV; Sialidase.

Dedico este trabalho a minha mãe e meu pai, Danistela e Júlio, por todo o amor incondicional, pelo apoio nas minhas escolhas e por serem os maiores orgulhos e exemplos da minha vida.

Dedico a meu irmão Bruno, pela pessoa maravilhosa que é, com quem eu cresci, amadureci e aprendi a partilhar.

Dedico a minha vó Yara, por sempre estar presente em toda minha vida. E também aos meus avós, Irene e Júlio, que embora não os tenha conhecido, sei que estariam felizes nesse momento.

Agradeço a Deus, por mais essa oportunidade e conquista na minha vida.

A minha orientadora Camila, que me acolheu desde o primeiro momento, e mesmo estando distante, sempre se manteve presente, seja pelo Skype ou pelos (muitos) áudios e e-mails.

A minha coorientadora Márcia, pela oportunidade e que me recebeu no laboratório de portas abertas, desde o primeiro pedido de estágio, e que eu tenho como exemplo de professora.

A minha coorientadora Larissa (Mams), que foi um anjo e uma mãe pra mim desde o primeiro dia, e se tornou em um dos maiores presentes que eu tive nesse período: uma grande amiga.

Ao meu alicerce desde meu primeiro dia em Botucatu, Júlia (Seri), Bárbara (Mafa) e Alessandra (Piga), por ter vocês em minha vida, desde o primeiro dia na Rep Our, e por toda a amizade durante todos esses anos.

A meu namorado Wagner, por todo o companheirismo, paciência, atenção, alegrias e lanches no “Punk” nesses últimos anos.

Aos amigos que estreitei laços graças ao laboratório, Giovana (Tucu), Júlia (Xorona), Mariana (Murta) e Jeniffer (Guenta), obrigado pela companhia, por todas as risadas no dia-dia e por todos os “bar do will”.

A todos os demais colegas do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-fetal, pela convivência e ensinamentos durante esse período.

Aos meus amigos da faculdade, especialmente Daniel (Coisinha) e Everson (Rolezero), por toda a amizade e convívio na melhor casa que tive em Botucatu.

Aos meus amigos de Mirassol, Bárbara e Bruno, que mesmo depois de tantos anos após o fim do ensino médio, a amizade ainda prevalece.

A todos da minha Família que me apoiaram e a Francisca, que cuidou de mim por toda a vida.

A todos os meus professores do ensino básico, que contribuíram para minha formação como profissional e como pessoa, especialmente aqueles que me marcaram e alguma forma: Niete, Ana Amélia, Zezé, Elza, Márcia, Sandra, Rita, Marcela, Angélica, Marcelo e Paulo. Muito obrigado.

Aos professores Fábian Zalazar, Fabián Tedeschi e a Universidad Nacional del Litoral, que tornaram meu curto intercâmbio na Argentina uma experiência incrível, por me receberem e acolherem muito bem. Assim como os amigos que fiz lá, graças

ao Pokémon, que se tornaram pessoas especiais pra mim.

À UNIPEX e ao laboratório VIDAVET, pela estrutura que permitiu a realização desse trabalho.

À secretária da pós-graduação, Vânia Soler, por todo amparo frente a toda a burocracia nesse tempo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela bolsa concedida que ajudou a me manter nesse período.

Sumário

1. Resumo.....	1
2. Abstract.....	3
3. Revisão da Literatura.....	6
4. Referências Bibliográficas.....	13
5. Artigo Científico.....	20
6. Anexos.....	42

1. Resumo

A infecção cervical pelo papilomavírus humano (HPV) é uma das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) mais comuns nas mulheres sexualmente ativas. Os cerca de 40 genótipos de HPV genitais podem ser classificados em HPVs de baixo risco (lrHPV) e alto risco oncogênico (hrHPV). Os genótipos de hrHPV, principalmente os HPV16 e HPV18, quando persistentes, podem levar ao desenvolvimento do câncer de colo do útero e consequentemente à não eliminação viral (*clearance*). Outros fatores, além do genótipo viral, podem interferir para o *clearance* como, por exemplo, a presença de vaginose bacteriana, a principal alteração da microbiota vaginal em mulheres em idade reprodutiva. Dentre as espécies bacterianas relacionadas a vaginose, a *Gardnerella vaginalis* está presente em quase a totalidade dos casos. A *G. vaginalis* é responsável pela produção da enzima sialidase, um de seus fatores de virulência e está ligada a formação do biofilme, onde estudos recentes sugerem que seu gene codificador (GVSI) esteja associado a persistência do HPV. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi comparar as cargas de *G. vaginalis* e a frequência do GVSI em amostras cérvico-vaginais de mulheres com HPV16 e/ou HPV18 persistente(s), com aquelas que fizeram o *clearance* no período de 11 meses após a infecção. De uma coorte de um estudo prévio, foram identificadas 462 mulheres HPV-positivas, das quais foram selecionadas 104 (22,5%) participantes que foram positivas para os genótipos HPV16 e/ou HPV18 no momento da inclusão. As amostras cérvico-vaginais foram obtidas no momento de inclusão e após o *follow-up*. A partir do resultado do HPV nos dois momentos, as participantes foram alocadas em dois grupos de estudo: “persistência” ou “*clearance*” do HPV. Foram utilizados lavados cérvico-vaginais para determinar a quantificação do gene 23s rRNA de *G. vaginalis* e a detecção de GVSI por PCR em tempo real quantitativo (qPCR). Das 104 participantes, 31 (29,8%) eliminaram a infecção por HPV16, HPV18 e outros hrHPVs previamente detectados após 11 meses, enquanto 73 (70,2%) persistiram com pelo menos um dos dois genótipos. Observou-se que a carga de *G. vaginalis* cervico-vaginal no momento da inclusão foi maior no grupo persistência [9.4E+02 (0-3.0E+05) cópias/uL] quando comparada ao grupo *clearance* [4.4E+01 (0-7.7E+04) cópias/uL]

($p=0,03$). Não foi encontrada associação entre a positividade de GVSI no momento da inclusão com o desfecho da infecção por HPV16/HPV18 ($p=0,09$). Portanto, os achados em relação às cargas de *G. vaginalis* reforçam o efeito negativo da alteração da microbiota vaginal na eliminação da infecção cervical por HPV de alto risco, entretanto, a positividade para o gene codificante (GVSI) não parece estar associada à persistência do HPV16/HPV18 cervical.

Palavras-chave: HPV; *Gardnerella vaginalis*; sialidase; *clearance*.

2. Abstract

Cervical infection by human papillomavirus (HPV) is one of the most common sexually transmitted infections (STIs) in sexually active women. The approximately 40 genital HPV genotypes can be classified into low-risk HPVs (lrHPV) and high oncogenic risk (hrHPV). The hrHPV genotypes, especially HPV16 and HPV18, when persistent, can lead to the development of cervical cancer and consequently no viral elimination (clearance). Other factors, in addition to the viral genotype, may interfere with clearance, such as, for example, the presence of bacterial vaginosis, the main change in the vaginal microbiota in women of reproductive age. Among bacterial species related to vaginosis, *Gardnerella vaginalis* is present in almost all cases. *G. vaginalis* is responsible for the production of the sialidase, one of its virulence factors and is associated to the formation of the biofilm, and recent studies have shown that its encoding gene (GVSI) could be associated with the persistence of HPV. Therefore, the aim of the study was to compare cervicovaginal loads of *G. vaginalis* and the prevalence of GVSI in women with persistent HPV16 and/or HPV18 infection with those who cleared the infection after 11 months. Of a previous study cohort of 462 HPV-positive women, we enrolled 104 (22.5%) participants who had positive baseline tests for HPV16 and/or HPV18. Upon cohort enrollment, participants answered a questionnaire for assessment of sociodemographic, behavioral and clinical data. Cervicovaginal samples were obtained at baseline and at the follow-up visit. Cervical samples were tested in the two time points for HPV genotyping. Based on the HPV status at follow up, we allocated the participants in the two study groups: HPV "persistence" or "clearance". It was used cervicovaginal fluids to determine the loads of *G. vaginalis* 23s rRNA gene and the detection of GVSI by quantitative real-time PCR (qPCR). Of the 104 participants, 31 (29.8%) cleared HPV16, HPV18 and hrHPVs infection previously detected after 11 months, while 73 (70.2%) persisted with at least one of the two genotypes. Higher baseline loads of *G. vaginalis* were observed in persistence group [9.4E+02 (0–3.0E+05) copies/uL] when compared to participants who cleared the infection [4.4E+01 (0–7.7E+04) copies/uL] ($p=0.03$). No association was found between baseline GVSI-positivity with HPV16/HPV18 infection outcome ($p=0.09$). Then, the present data reinforce the negative effect of the altered vaginal microbiota in the clearance of high-risk HPV cervical

infection through the assessment of *G. vaginalis* loads. Positivity for sialidase-encoding *G. vaginalis* does not seem to be associated with persistence of cervical HPV16/HPV18.

Key words: HPV; *Gardnerella vaginalis*; Sialidase; clearance.

Revisão de Literatura

3. Revisão de Literatura

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus da família *Papillomaviridae*, caracterizado por ser não envelopado, constituído por um capsídeo de simetria icosaédrica, que engloba uma molécula de DNA circular de dupla fita com aproximadamente 8000 bp(1). O genoma do HPV é dividido em três regiões. A primeira delas é uma região regulatória (LCR, *long control region*) que contém a origem de replicação do DNA e, portanto, responsável pelo início do ciclo viral. A próxima região é a precoce que codifica 6 proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) que possuem ação enzimática ou reguladora no ciclo viral. Dentre essas, merecem destaque as proteínas E6 e E7, que inativam, respectivamente, os supressores tumorais p53 e pRB da célula infectada, estando envolvidas diretamente na imortalização dessas células e, portanto, no desenvolvimento de neoplasias(2–4). Finalmente, os genes da região tardia (*late*) que codificam as duas proteínas que compõe o capsídeo viral, a L1 e L2, altamente imunogênicas, utilizadas na produção de vacinas profiláticas(4). O HPV é um vírus epiteliotrópico, ou seja, sua infecção ocorre pela camada basal do epitélio a partir de micro lesões, e após migrar para as camadas intermediárias do epitélio, se replica, podendo levar ao aparecimento de lesões proliferativas(5).

Atualmente, são descritos mais de 100 genótipos de HPV que infectam o homem, dentre os quais 40 tem afinidade para o epitélio da região anogenital, onde alguns tipos estão envolvidos na etiologia de lesões neoplásicas(1). Dessa forma, a classificação dos HPV genitais é feita de acordo com seu potencial oncogênico, divididos em genótipos de baixo (lrHPV) ou intermediário risco e alto risco (hrHPV) oncogênico, sendo este responsável por 5% de todos os cânceres diagnosticados anualmente no mundo(6–9). Em relação aos lrHPV, destacam-se os HPV6 e HPV11, associados ao desenvolvimento de verrugas

genitais. Já os HPV16 e HPV18 são associados ao maior período de persistência da infecção levando ao desenvolvimento das lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos do colo do útero, sendo responsáveis por 70% dos casos de carcinomas epidermóides e mais de 80% dos adenocarcinomas do colo do útero(10–13).

As infecções por HPV genitais são, em geral, de caráter transitório, visto que a maioria das infecções é eliminada (*clearance*) pelo sistema imunológico do hospedeiro num período de 1 a 2 anos(14), entretanto, algumas infecções permanecem, pela presença da infecção por hrHPV(8). A literatura é consistente ao demonstrar que o HPV16 apresenta os períodos de infecção mais longos, mesmo quando comparado aos demais HPV de alto risco oncogênico(15). Um estudo na Holanda com mulheres entre 16 e 29 anos mostrou uma persistência de 58,1% pelo HPV16 e 39,6% pelo HPV18 após um período de 12 meses(16). Além disso, também foi apontado que a presença de múltiplos genótipos de HPV atrasa o tempo de *clearance*(17).

Contudo, além do genótipo viral, o tempo de *clearance* do HPV pode ser influenciado por outros fatores como: dietas pobres em nutrientes, uso de absorventes internos, contraceptivos de progesterona, presença de outro vírus como o da imunodeficiência humana (HIV)(18,19) e presença de coinfeções, relacionadas ao ambiente vaginal, como as endocervicites causadas pela *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*. A literatura mostra que a infecção cervical pela *Chlamydia trachomatis* é co-fator para o desenvolvimento de lesões HPV-induzidas(20). Um estudo recente analisou a presença de HPV e a citologia oncótica com a coinfeção por *C. trachomatis*, no qual foi encontrada uma carga maior de DNA desta bactéria associada a presença do HPV, e, quando considerada a citologia juntamente às mulheres com *C.*

trachomatis e HPV, elas possuíam um risco muito maior de ter um citologia alterada(21). Além do mais, apesar de estudos mais escassos, já foi apontado que mulheres com *T. vaginalis* possuem maior risco na aquisição de HPV de alto risco(22).

Ainda nesse contexto, vale destacar a principal alteração do ambiente vaginal, a vaginose bacteriana, que é caracterizada como a principal disbiose da microbiota vaginal, onde a microbiota predominantemente lactobacilar Gram positiva é substituída por uma microbiota cocobacilar Gram positiva e Gram negativa(23). O padrão ouro para seu diagnóstico é o descrito por Nugent(24), baseado na avaliação morfológica de esfregaços vaginais corados pelo método de Gram e classificadas de acordo com um escore, sendo de 0-3, microbiota normal, 4-6, microbiota intermediária e 7-10, vaginose bacteriana. A partir disso, alguns estudos foram realizados para determinar o papel dessa microbiota no contexto das infecções pelo HPV(25,26), onde foi demonstrado que a presença da vaginose bacteriana está associada tanto à prevalência da infecção pelo vírus, como também a uma diminuição significativa na taxa de *clearance* viral(27,28). Porém, esses estudos foram baseados nesses métodos microscópicos, que, embora amplamente utilizados, não permitem avaliar e determinar de forma precisa a real composição bacteriana deste ambiente.

Para estabelecer a composição bacteriana presente em um ambiente, a evolução dos métodos moleculares, como as técnicas de sequenciamento de nova geração, contribuiu pela determinação do microbioma local. Nesse sentido, Ravel et al.(29), em 2011, caracterizaram pela primeira vez o microbioma vaginal de mulheres em idade reprodutiva. Tais autores verificaram que, apesar da grande diversidade microbiana presente nesse ambiente, o microbioma vaginal de todas as mulheres podem ser

agrupadas em 5 tipos de comunidades bacterianas vaginais (*community-state type*, CST), conforme predominância de determinadas espécies. Do total, 4 são caracterizadas pelo predomínio de *Lactobacillus* sp: CST-I (*Lactobacillus crispatus*), CST-II (*L. gasseri*), CST-III (*L. iners*) e CST-V (*L. jensenii*). Na comunidade bacteriana vaginal remanescente, a CST-IV, a predominância de espécies de lactobacilos é substituída por uma maior diversidade de espécies bacterianas, onde se encontra a maioria dos casos de vaginose bacteriana e na qual estudos mostram que a prevalência é maior dentre as mulheres com HPV persistente(30).

Embora a vaginose bacteriana esteja associada a uma grande diversidade bacteriana no ambiente vaginal, a espécie *Gardnerella vaginalis* está presente em quase a totalidade dos casos(31), sendo o primeiro microrganismo associado à vaginose bacteriana(32). Para sua classificação, Santiago et al.(35), a partir de métodos de análise de restrição de DNA ribossomal (ARDRA), detectou a presença de três genótipos de *G. vaginalis* diferentes. Posteriormente, Ahmed et al.(33) realizou uma nova classificação, pelo pirossequenciamento, onde foram identificados 4 subgrupos (1 a 4). Em 2016, mais um achado, usando sequenciamento de Sanger do gene CPN60, confirmou a existência dos 4 subgrupos, classificados como A, B, C e D, equivalente aos grupos 4, 2, 1 e 3, respectivamente(33,34). Por fim, ainda mais recente, um outro estudo partir da hibridização de DNA-DNA (dDDH) e da identidade média de nucleotídeos (ANI), identificou, a partir de 10 linhagens de *G. vaginalis*, 3 novas espécies genômicas de *Gardnerella* sp., que com base na classificação de Ahmed et al.(33), o grupo 4 contém 2 espécies descritas como *G. leopoldii* e *G. swidsinskii*, o grupo 2 contém 3 espécies, descritas como *G. piovii* e o grupo 1 possui duas espécies, descrita como *G. vaginalis*(38).

A participação de *G. vaginalis* no desfecho do HPV não está muito bem consolidada(32). Dois estudos brasileiros demonstraram achados não congruentes, ambos realizados por reação em cadeia polimerase (PCR), sendo um realizado na Bahia, de 2017, que mostrou a associação da presença dessa bactéria no ambiente vaginal com a presença de lesões cervicais, enquanto outro mais recente, realizado no Paraná, mostrou que somente a bactéria *G. vaginalis* não estaria associada as lesões precursoras do câncer do colo de útero(36,37).

Dessa forma, para entender o papel da *G. vaginalis* nesse cenário, vale destacar um de seus fatores de virulência, que é a capacidade de algumas de suas linhagens de produzir e liberar a enzima sialidase, com características patogênicas ao ambiente vaginal(38), que tem como função hidrolisar o ácido siálico das células epiteliais do hospedeiro, expondo sítios de ligação que facilitam a adesão de *G. vaginalis* ao epitélio(39–42).

O modelo aceito atualmente de vaginose bacteriana mostra que esta adesão inicia a formação do biofilme, tendo suas camadas mais internas formadas pela interação com a *Prevotella bivia*, também produtora de sialidase(23). A presença de biofilmes associados à vaginose bacteriana propicia uma proteção dos microrganismos que os compõe da ação do peróxido de hidrogênio, ácido láctico e bacteriocinas secretadas em condições normais pelos *Lactobacillus* sp.. Além do papel importante na consolidação dos biofilmes vaginais, as moléculas de ácido siálico, liberadas pela ação das sialidases, podem ser utilizadas no metabolismo energético da bactéria(43), ou ainda podem recobrir a superfície bacteriana, dificultando a fagocitose(41,44). Além disso, estudos já demonstraram que as sialidases possuem capacidades imunomoduladoras, sendo

capazes de diminuir a viscosidade do conteúdo cérvico-vaginal e exercer ação hidrolítica nas imunoglobulinas A presentes na secreção cervical(39,45).

Portanto, as bactérias *G. vaginalis* sialidases-produtoras possuem um papel importante pela capacidade de modular a resposta imunológica local. Um estudo avaliou a atividade de sialidase em mulheres com lesões cervicais, comparadas a mulheres saudáveis, e nele foi mostrado que a atividade de sialidase era maior na infecção bacteriana quando comparada a infecção fúngica e ao controle negativo, e também havia uma atividade maior nas mulheres com carcinoma intraepitelial cervical, quando comparada a mulheres com outras neoplasias(46). Contudo, esse estudo não avaliou as espécies bacterianas e os genótipos de HPV envolvidos, o que sugere a necessidade de mais investigações acerca do envolvimento desses agentes nessa patogênese.

Os resultados publicados por Di Paola et al.(30), em agosto de 2017, mostraram que mulheres com infecção persistente por HPV de alto risco, no período de um ano, apresentaram uma maior carga do gene codificante da sialidase de *G. vaginalis* e uma maior frequência da CST-IV, mesmo em um número amostral limitado. Em contraste, outro achado que analisou o microbioma, mostrou que os altos níveis de *G. vaginalis* estavam associados ao grupo que fez o *clearance* do HPV no período de 2 anos, em relação ao grupo que persistiu e ao controle negativo(47).

Por isso, considerando a importância dos achados recentes, é fundamental que se estabeleça a relação da *G. vaginalis*, assim como sua capacidade como produtora de sialidase, para as taxas de *clearance* do HPV cérvico-vaginal. Para isso, a quantificação de *G. vaginalis* e a detecção de sialidase, bem como a associação com a eliminação ou

persistência da infecção pelo HPV, permitirão a melhor compreensão da relação entre a microbiota vaginal e o desfecho da infecção pelo HPV.

4. Referências

1. Hausen H zur. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 1996;1288(2):F55–78. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304419X96000200>
2. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002;89(2):213–28.
3. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990;63(6):1129–36.
4. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* [Internet]. 1989;8(13):4099–105. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=401588&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;47:2–13.
6. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006;118(12):3030–44.
7. Dalton-Griffin L, Kellam P. Infectious causes of cancer and their detection. *J Biol.* 2009;8(7):1–5.
8. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 2002;55(4):244–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919208>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1769629>

-
9. Almonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, et al. Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(9):1654–63.
 10. Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):3–13.
 11. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621–32.
 12. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V., et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518–27.
 13. Bogani G, Taverna F, Lombardo C, Borghi C, Martinelli F, Signorelli M, et al. Retrospective study of the influence of HPV persistence on outcomes among women with high-risk HPV infections and negative cytology. *Int J Gynecol Obstet*. 2017;138(1):62–8.
 14. Ginindza TG, Dlamini X, Almonte M, Herrero R, Jolly PE, Tsoka-Gwegweni JM, et al. Prevalence of and associated risk factors for high risk human papillomavirus among sexually active women, Swaziland. *PLoS One*. 2017;12(1):1–18.
 15. Richardson H, Abrahamowicz M, Tellier PP, Kelsall G, Du Berger R, Ferenczy A, et al. Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(5):1149–56.
 16. van der Weele P, van Logchem E, Wolffs P, van den Broek I, Feltkamp M, de Melker H, et al. Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women. *J Clin Virol* [Internet]. 2016;83:6–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.020>
 17. Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, et al.

-
- Long-term persistence of prevalently detected human papillomavirus infections in the absence of detectable cervical precancer and cancer. *J Infect Dis.* 2011;203(6):814–22.
18. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: A population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2003;158(5):486–94.
 19. Adler D, Wallace M, Bennie T, Abar B, Sadeghi R, Meiring T, et al. High Risk Human Papillomavirus Persistence Among HIV-infected Young Women in South Africa. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2015;33:219–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.02.009>
 20. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer in Brazil and the Philippines . *J Infect Dis.* 2002;185(3):324–31.
 21. Ji Y, Ma XX, Li Z, Peppelenbosch MP, Ma Z, Pan Q. The Burden of Human Papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* Coinfection in Women: A Large Cohort Study in Inner Mongolia, China. *J Infect Dis.* 2019;219(2):206–14.
 22. Menon S, Broeck D Vanden, Rossi R, Ogbe E, Harmon S, Mabeya H. Associations Between Vaginal Infections and Potential High-risk and High-risk Human Papillomavirus Genotypes in Female Sex Workers in Western Kenya. *Clin Ther* [Internet]. 2016;38(12):2567–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.10.005>
 23. Muzny CA, Taylor CM, Swords WE, Tamhane A, Chattopadhyay D, Cerca N, et al. An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis.* 2019;220(9):1399–405.
 24. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is

-
- improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29(2):297–301.
25. Gallo MF, Macaluso M, Warner L, Fleenor ME, Hook EW, Brill I, et al. Bacterial Vaginosis, Gonorrhea, and Chlamydial Infection Among Women Attending a Sexually Transmitted Disease Clinic: A Longitudinal Analysis of Possible Causal Links. *Ann Epidemiol.* 2012;22(3):213–20.
 26. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNairn D, Wabwire-Mangen F, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.* 1997;350(9077):546–50.
 27. Gillet E, Meys JFA, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: A meta-analysis. *BMC Infect Dis [Internet].* 2011;11(1):10. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/10>
 28. King CC, Jamieson DJ, Wiener J, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo AM, et al. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2011;2011.
 29. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(SUPPL. 1):4680–7.
 30. Di Paola M, Sani C, Clemente AM, Iossa A, Perissi E, Castronovo G, et al. Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Sci Rep [Internet].* 2017;7(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>
 31. Marconi C, Donders GG, Parada CMGL, Giraldo PC, Da Silva MG. Do *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* sp. and *Leptotrichia* sp. change the local innate immune response and sialidase activity in bacterial vaginosis? *Sex Transm Infect.* 2013;89(2):167–73.

-
32. Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified "nonspecific" vaginitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1955;69(5):962–76.
 33. Ahmed A, Earl J, Retchless A, Hillier SL, Rabe LK, Chernes TL, et al. Comparative genomic analyses of 17 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* provide evidence of multiple genetically isolated clades consistent with subspeciation into genovars. *J Bacteriol.* 2012;194(15):3922–37.
 34. Schellenberg JJ, Jayaprakash TP, Gamage NW, Patterson MH, Vaneechoutte M, Hill JE. *Gardnerella vaginalis* subgroups defined by *cpn60* sequencing and sialidase activity in isolates from Canada, Belgium and Kenya. *PLoS One.* 2016;11(1):1–12.
 35. Vaneechoutte M, Guschin A, Van Simaey L, Gansemans Y, Van Nieuwerburgh F, Cools P. Emended description of *Gardnerella vaginalis* and description of *gardnerella leopoldii* sp. nov., *gardnerella piovii* sp. nov. and *Gardnerella swidsinskii* sp. nov., with delineation of 13 genomic species within the genus *Gardnerella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69(3):679–87.
 36. Amorim AT, Marques LM, Campos GB, Lobão TN, de Souza Lino V, Cintra RC, et al. Co-infection of sexually transmitted pathogens and Human Papillomavirus in cervical samples of women of Brazil. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):1–12.
 37. Suehiro TT, Malaguti N, Damke E, Uchimura NS, Gimenes F, Souza RP, et al. Association of human papillomavirus and bacterial vaginosis with increased risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 2019;29(2):242–9.
 38. Hardy L, Jespers V, Van Bulck M Den, Buyze J, Mwambarangwe L, Musengamana V, et al. The presence of the putative *Gardnerella vaginalis* sialidase A gene in vaginal specimens is associated with bacterial vaginosis biofilm. *PLoS One.* 2017;12(2):1–11.
 39. Lewis WG, Robinson LS, Perry J, Bick JL, Peipert JF, Allsworth JE, et al. Hydrolysis

-
- of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin a (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. *J Biol Chem*. 2012;287(3):2079–89.
40. Varki A. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconj J*. 2009;26(3):231–45.
 41. Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1253(1):16–36.
 42. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*. 2005;106(5):1013–23.
 43. Severi E, Hood DW, Thomas GH. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology*. 2007;153(9):2817–22.
 44. Harvey HA, Swords WE, Apicella MA. The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *J Autoimmun*. 2001;16(3):257–62.
 45. Lewis WG, Robinson LS, Gilbert NM, Perry JC, Lewis AL. Degradation, foraging, and depletion of mucus sialoglycans by the vagina-adapted actinobacterium *Gardnerella vaginalis*. *J Biol Chem*. 2013;288(17):12067–79.
 46. Dasari S, Rajendra W, Valluru L. Evaluation of microbial enzymes in normal and abnormal cervicovaginal fluids of cervical dysplasia: A case control study. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 47. Arokiyaraj S, Seo SS, Kwon M, Lee JK, Kim MK. Association of cervical microbial community with persistence, clearance and negativity of Human Papillomavirus in Korean women: a longitudinal study. *Sci Rep [Internet]*. 2018;8(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33750-y>

Artigo científico

Manuscrito apresentado de acordo com as normas para submissão no periódico *Journal of Medical Microbiology* (Fator de impacto: 2.112).

5. Artigo Científico

Increased cervicovaginal loads of *Gardnerella vaginalis* in immunocompetent women with persistent high-risk human papillomavirus infection

Rafael Belletti¹, Larissa Doddi Marcolino¹, Juliano Novak¹, Carolina Sanitá Tafner Ferreira¹, Aline do Nascimento Bolpetti¹, Gabriel Vitor da Silva Pinto¹, Márcia Guimarães da Silva¹, Camila Marconi^{1,2}

¹ Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP, São Paulo State University, São Paulo, Brazil;

² Department of Basic Pathology, Setor de Ciências Biológicas, UFPR, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

Abstract

Background: Two genotypes of high-risk human papillomavirus (hrHPV), HPV16 and HPV18, are responsible for the majority of the cases of cervical cancer. Bacterial vaginosis decreases rates of HPV clearance, although its mechanistic basis has not been elucidated. *Gardnerella vaginalis* is the main species associated with bacterial vaginosis and the major source of cervicovaginal sialidases. Sialidase-encoding gene of *G. vaginalis* (GVSI) was recently proposed as a potential marker for HPV persistence.

Objective: To compare the cervicovaginal loads of *G. vaginalis* and the frequency of GVSI gene in women with persistent HPV16 and/or HPV18 infection with those who cleared the infection after 11 months.

Methods: We included cervicovaginal samples of 104 HPV16- and/or HPV18-positive women of previous cohort study. Samples were obtained at baseline and at follow-up. We

performed HPV genotyping using Linear Array HPV Genotyping kit (Roche Molecular Systems, CA) at the two time points. Based on the HPV16/HPV18 status at enrollment and follow up, we allocated the participants in 2 groups: "persistence" or "clearance". We used baseline cervicovaginal for quantification of *G. vaginalis* 23s rRNA gene and detecting GVSI using real-time PCR (qPCR). We compared *G. vaginalis* loads and GVSI-positivity between the groups using, respectively, Mann-Whitney non-parametric test and chi-squared test, with p-value <0.05 considered 0significant.

Results: Of the 104 participants, 31 (29.8%) cleared the hrHPVs detected at baseline, while 73 (70.2%) persisted with at least one of the baseline genotypes. Increased *G. vaginalis* baseline cervicovginal loads were observed in persistence group [9.4E+02 (0 – 3.0E+05) copies/uL] in comparison to clearance group [4.4E+01 (0–7.7E+04) copies/uL] (p-value=0.03). Frequency of GVSI at baseline did not differ between the 2 study groups (p-value=0.09).

Conclusion: These data reinforce the negative effect of vaginal microbiota in the clearance of hrHPV. Sialidase-producer strains of *G. vaginalis* does not seem to confer additional disadvantages for hrHPV clearance.

Introduction

According to the World Health Organization, cervical cancer is the fourth most frequent cancer in women and its cause is due to human papillomavirus (HPV) infection(1). Urogenital HPV infection is one of the most frequent sexually transmitted infections (STIs) worldwide and may be caused by HPV genotypes of low- and high- oncogenic risk (lrHPV and hrHPV, respectively). Among hrHPV genotypes, HPV16 and HPV18 are the most frequent in with high grade intraepithelial lesions and invasive cervical carcinomas, responsible for 70% of squamous cell carcinomas and more than 80% of cervical adenocarcinomas(2–5).

In general, time for cervical clearance of HPV cervical infection are cleared in one to two years(6). However, persistence of HPV infection for longer periods of time is the main factor leading to cervical HPV-induced lesions(7). Literature shows that HPV16 has the highest persistence rate, even when compared to other hrHPVs(8). Besides HPV genotype, other factors also may influence viral *clearance* as nutrient-poor diets, use of tampons, progesterone contraceptives, human immunodeficiency virus (HIV) infection and the presence of abnormal vaginal microbiota(7,8).

Normally, vaginal microbiota is dominated by *Lactobacillus* spp., and, when replaced by other bacterial types, is mostly interpreted as bacterial vaginosis. Bacterial vaginosis has been associated with increased risk for acquisition of several STIs, including HPV(9,10). Although bacterial vaginosis has a high bacterial diversity, *Gardnerella vaginalis* is present in nearly all cases and was the first microorganism associated with this condition(11,12). Sialidase production is one of the most important virulence factor of *G. vaginalis*(13).

Sialidases hydrolyze sialic acid from host epithelial cells, exposing binding sites that facilitate bacteria adhesion to the epithelium leading to biofilm (14–16). Additionally, *G. vaginalis* sialidases decrease the viscosity of cervicovaginal mucus and hydrolise local immunoglobulin A(17,18).

Despite the sialidase-encoding gene of *G. vaginalis* (GVSI) is not present in all strains, *G. vaginalis* is acknowledged as the main source of sialidase in the vaginal milieu(19–21). Recently, it has been suggested that GVSI may be used as a marker for persistent hrHPV infection(22).

Therefore, considering the importance of better understanding the relation between components of vaginal microbiota with outcome of hrHPV infection, we aimed to compare the baseline loads of *G. vaginalis*, of women with persistent HPV16 and/or HPV18 infection with those who cleared the infection after 11 months. Also, we aimed to compare the frequency GVSI gene between the two study groups.

Material and Methods

Study design and population

This study population involved the cohort “HPV-*Chlamydia trachomatis*” from the longitudinal study entitled “Prevalence of coinfection and factors associated with Human Papillomavirus (HPV) and *Chlamydia trachomatis* in reproductive age women attended in the cervical cancer prevention Program in southeast region of Brazil”. The longitudinal study, as well as the present study, were reviewed and approved by the Research Ethics

Committee of the Botucatu Medical School/UNESP (protocol numbers 3.140.843 and 3.556.942, respectively) and all women signed a form.

The longitudinal study for cohort constitution enrolled 1638 reproductive-aged women attending all the 18 primary health care clinics in Botucatu-SP, Brazil for pap-testing. Among them, 544 (33.2%) were positive for HPV infection and were recruited for follow up after 11 months. A total of 78 participants did not return for follow-up and were then excluded from the study. From the 462 HPV-positive participants who returned at follow-up, selected those 108 (23.4%) that tested positive for HPV16 and/or HPV18 genotypes upon enrollment. However, samples of 4 participants had insufficient volume for carrying out the analysis of the current study. Thus, cervicovaginal samples of 104 participants were finally enrolled (Figure 1).

We constituted two study groups according to hrHPV status at enrollment and at follow-up. Women were included in ‘clearance group’ if they eliminated all hrHPV(22–24) genotypes detected upon enrollment. Women we assigned to ‘persistence group’ if they persisted with at least one of hrHPV detected at baseline. None of the incident HPV infections observed were considered for groups assignment.

Data and samples collection

As part of the enrollment procedures for the cohort “HPV-*Chlamydia trachomatis*”, data on sociodemographic, physical, behavioral and gynecological history, as well as clinical findings at the time of inclusion of women in the study were obtained during a face-to-face interview using a standardized questionnaire. All data were entered into a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft, MA).

Participants underwent same sampling procedures at enrollment and follow-up visit. After speculum insertion, we took mid-third vaginal swabs for smearing onto microscopic glass slides and further classification of the microbiota, according to Nugent et al.(25) We also sampled the vaginal vault using for *Trichomonas vaginalis* detection by culture in Diamond's medium, as previously described(26). We took endocervical samples by rotating 360° the cervical brushes three times. Brushes-containing samples were immersed in TET (10mM Tris-HCl pH=8.0; 1 mM EDTA; 0.5% Tween 20) buffer and keep at -20°C until analysis. These samples were then used for *Chlamydia trachomatis* detection, as described previously (11) and also for HPV detection and genotyping, as detailed bellow. Finally, cervicovaginal fluid were sampled by inserting 3 ml of sterile 0.9% NaCl on the lateral vaginal wall, homogenized with local content and recovered in at volume using a plastic sterile pipette. Fluid samples were stored at -20°C until processing *G. vaginalis* 23s rRNA gene quantification and GVSI detection.

HPV detection and genotyping

Cervical samples were used for DNA extraction using the AmpliLute Liquid Media DNA Extraction Kit (Roche Molecular Systems, CA). HPV genotyping was performed using the Linear Array HPV Genotyping kit (Roche Molecular Systems, CA), based on hybridization of the amplified product with specific probes for 36 genotypes of anogenital on a membrane strip.

Cloning and absolute quantification of *G. vaginalis* 23s rRNA gene copies

DNA extraction was performed from the cervicovaginal fluid using the UltraClean Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, CA) as recommended by the manufacturer. The samples were quantified in Epoch spectrophotometer (Biotek, VT) to confirm the quality of the extraction by the absorbance ratio 260/280nm.

For the cloning step, to obtain the plasmid DNA, the DNA extracted of *G.vaginalis* ATCC 14018 standard strain were used for amplification by PCR, on the region 23s rRNA of *G.vaginalis*, using the primers F-GV1 (5'-TTACTGGTGTATCACTGTAAGG-3') and R-GV3 (5'-CCGTCACAGGCTGAACAGT-3')(11). The amplified products were used on the ligation step using pGEM T Easy Vector System Kit (Promega, WI), cloned into *Escherichia coli* DH5- α (Invitrogen, CA) and sequenced using 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA), confirmed by BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The absolute quantification of *G. vaginalis* 23s rRNA was performed by real-time PCR (qPCR) using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, MA), primers F-GV1 and R-GV3, in QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA) following these conditions: 95°C for 10 minutes, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 30 seconds followed by a dissociation stage: 95°C for 15 seconds; 60°C for 1 minute and 95°C for 15 minutes. Samples with a melting temperature value between 83°C and 85°C were considered positive. For the constitution of a standard curve were used three dilutions, 10^7 , 10^6 and 10^5 from the plasmid DNA and the samples were interpolated. Loads of *G. vaginalis* 23s rRNA gene concentrations were expressed as the number of copies per volume (mL) of cervicovaginal fluid.

GVSI gene real-time PCR for sialidase detection

To detect GVSI gene of sialidase A were used Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, MA) and primers F-GVSI (5'-GACGACGGCGAATGGCACGA-3') and R-GVSI (5'-TACAAGCGGCTTTACTCTTG-3')(21). It was performed by StepOnePlus Real-Time System (Applied Biosystems, CA) following these conditions: 95°C for 10 minutes, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds, followed by a dissociation stage: 95°C for 15 seconds; 60°C for 1 minutes and 95°C for 15 minutes. Samples with a melting temperature value between 81°C and 82°C were considered positive.

Statistical analysis

Comparison of continuous data as sociodemographic, physical, behavioral, gynecological history, presence of 23s rRNA, GVSI genes and GVSI presence, between the women with persistence and clearance HPV group was performed by the Chi-squared or fisher's exact test. The Mann–Whitney non-parametric test was used to compare some sociodemographics data and the loads of *G. vaginalis* 23s rRNA gene between groups. For comparing frequency of GVSI gene among women with the highest loads of *G. vaginalis*, we selected those with loads superior to the 40th percentile (p40) that was equivalent to >526 copies of 23s rRNA gene/mL, and compared among groups using the Chi-squared test.

All analyses were performed using GraphPad Prism software (version 6.0, GraphPad, CA), with p-value<0.05 considered as statistically significant.

Results

Positivity for HPV16 and HPV18, as well as other hrHPV genotypes are displayed in Table 1. Overall baseline frequency rates of HPV16 and HPV18 amongst the 104 samples included in the study analysis were 75.0% (n=78) and 23.1% (n=24), respectively. Two participants (1.9%) were positive for HPV16 and HPV18. As detailed in Table 1, 55 out of the 78 women with HPV16 (independently of other hrHPV), were assigned to persistence group, as they also tested positive for HPV16 or cleared the HPV16, but remained positive for at least one of the hrHPV detected at the baseline. A total of 23 participants with at least HPV16 at enrolment, tested negative for all the baseline hrHPV genotypes at follow-up and were then included in the clearance group. Same criteria were adopted to allocate the 24 women with HPV18 and the 2 women with combined HPV16 and HPV18 infection at baseline. Eighteen of them were assigned to persistence group and 8 to the clearance group. Thus, overall persistence and clearance rates were 70.2% (n=73) and 29.8% (n=31), respectively.

Table 2 displays the sociodemographic, behavioural and gynecological history characteristics of the participants, according to the two study groups. Women of the two study groups did not differ for all variables assessed. Presence of other co-infections by *T. vaginalis* and *C. trachomatis* did not differ between the groups.

Features related to vaginal microbiota were compared between the study groups, as displayed in Table 3. We found no difference in positivity for microscopic BV at the baseline between the two groups ($p=0.20$). When combining (microscopic bacterial vaginosis plus intermediate microbiota as one category, we observed a higher percentage of such pattern in persistence group, although it did not reach statistical significance ($p<0.09$). Molecular-based analysis showed a significant higher frequency of positivity of the 23S rRNA gene of *G. vaginalis* in persistence group ($p=0.04$). Quantitative results also showed that loads of *G. vaginalis* 23S rRNA gene were significantly increased in persistence group ($p=0.03$). Regarding the frequency of GVS1 gene in the two groups, no statistical difference was found ($p=0.09$).

We further selected the subset of 45 women with the highest loads of *G. vaginalis* (cut-off > 526 copies/mL) from persistence ($n=37$) and clearance groups ($n=8$). Frequency of GVS1-positivity did not differ between persistence 86.4% ($n=32$) and clearance 75.0% ($n=6$) groups (P -value=0.59 at Fisher's exact test).

Discussion

Since *G. vaginalis* has been strongly associated with bacterial vaginosis, we aimed to determine whether its higher loads are associated with persistence of hrHPV. Our hypothesis was confirmed since we found that women with persistent HPV16/HPV18 infection have increased baseline loads *G. vaginalis*. In another way, no association was found between the sialidase-encoding gene and the outcome of HPV infection. The study

population showed homogeneity between groups, where in all sociodemographic, behavioural and gynecological history variants analyzed no association where found.

The *G. vaginalis* load association founded corroborated with the 12 months longitudinal study associating the microbiome composition and hrHPVs persistence that showed a higher average of *Gardnerella* on the persistence group compared to the clearance and negative ones for HPV(27). Contradictorily, amicrobiome-based study found that cervical *G. vaginalis* is enriched in HPV-clearance group, compared to negative and persistence ones, after 2 years of follow-up(28).

In terms of the persistence rate of 70.2% (73 out of the 104 participants) found in the present study, it is higher than a previous study conducted in 3282 young Dutch women that showed a 52.1% (176/338) persistence rate after 12 months (29). However, the microbiota of the latter study was not assessed so we can not exclude that bacterial vaginosis prevalence in the dutch cohort is lower than in the current study.

A better understanding of the role of *G. vaginalis* and its sialidase production are important due to its virulence potential on the formation of vaginal biofilms(14–16). In our findings, we could not corroborate with Di Paola et al.(27) that showed that the GVSI loads were increased in women with persistence of hrHPV, when compared those who cleared the infection. However, the latter study population was composed by 28 women, including women in postmenopausal age when higher *G. vaginalis* load are expected.

Although not all *G. vaginalis* strains are sialidase-producers(21), the higher prevalence of *G. vaginalis* in women with persistent HPV could explain the higher frequency rates of GVSI found in this group (even not statistically significant). Also, the *G. vaginalis* sialidase

produce variability explains that not even in the subset of 45 women with the highest *G. vaginalis* loads, the frequency of GVSI was not found between groups.

Among the risk factors for HPV persistence, the bacterial vaginosis has been an important factor. Studies have showed that the presence of bacterial vaginosis, the main type of vaginal microbiota alteration, is associated with both the prevalence of HPV infection and a significant decrease in viral clearance rate(30,31). Our findings did not corroborate with this association, even though the women with persistent hrHPV had a higher percentage for the presence of the abnormal microbiota, no statistical difference was found. However, microscopy is limited in terms of addressing the presence of certain bacterial species.

The study had some limitations, like we could not know control the HPV infection time upon inclusion, what could influence the HPV rate and the group constitution. Also, there was no assessment of the sialidase load, what could shown a better role of GVSI in the HPV outcome.

Thus, molecular biology is of great utility to understand the role of the vaginal microbiota for the natural history of HPV infection. In fact, when our results from molecular analysis confirmed the bacterial vaginosis associated species, *G. vaginalis*, with outcome of hrHPV infection.

Conclusion

Our findings showed an association between HPV16/HPV18 persistence with not only the presence, but also with a higher load of *G. vaginalis*, which means the bacteria could have an important role on the HPV outcome. But, when assessing the sialidase virulence factor,

no association between *G. vaginalis* sialidase encoding-gene and HPV outcome was found. So, further studies are needed for better understanding the role of *G. vaginalis* and also to investigate if another virulence factors could be associated with the persistence or clearance of HPV.

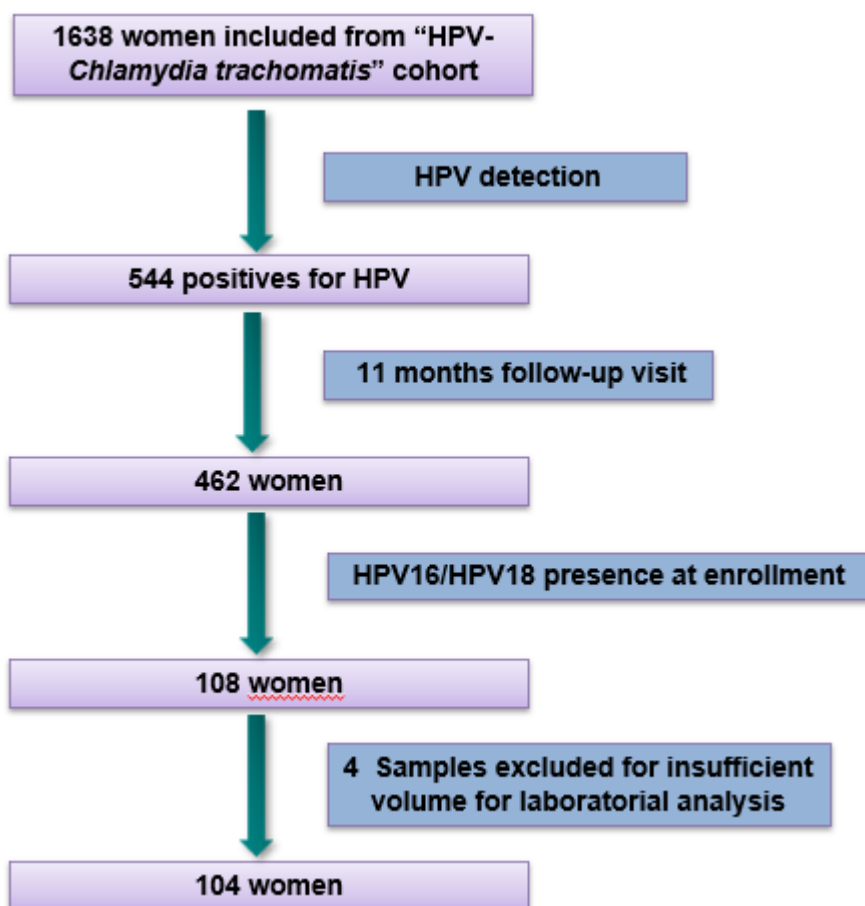


Figure 1. Flow chart of participants' inclusion from the cohort "HPV-*Chlamydia trachomatis*".

Table 1. Constitution of study's group according to the positivity for HPV16 and HPV18, as well as other high risk HPV (hrHPV) genotypes*.

N	Baseline HPV genotypes detected	HPV status at follow-up	Grouping
30	HPV16 ^a	positive for HPV16	Persistence
14	HPV16 ^b	negative for HPV16	Clearance
20	HPV16 + other hrHPV ^c	positive for HPV16 (accompanied by other hrHPV or not)	Persistence
5	HPV16 + other hrHPV ^d	negative for HPV16 and concordant for at least one hrHPV genotype detected at baseline	Persistence
9	HPV16 + other hrHPV ^e	negative for all hrHPV genotypes detected at baseline	Clearance
9	HPV18 ^d	positive for HPV18	Persistence
4	HPV18 ^d	negative for HPV18	Clearance
4	HPV18 + other hrHPV	positive for HPV18 (accompanied by other hrHPV or not)	Persistence
4	HPV18 + other hrHPV ^d	negative for HPV18, concordant for at least one hrHPV genotype detected at baseline	Persistence
3	HPV18 + other hrHPV	negative for all hrHPV genotypes detected at baseline	Clearance
1	HPV16 + HPV18 + other hrHPV ^f	positive for HPV16 (accompanied by other hrHPV)	Persistence
1	HPV16 + HPV18 + other hrHPV ^f	negative for all hrHPV genotypes detected at baseline	Clearance

*Considering hrHPV subgenus 2(22–24), including, but not limited to, 33, 52, 53 and 58.

^{a-f}A subset of participants had incident hrHPV: ^an=7, ^bn=3, ^cn=9, ^dn=2, ^en=4, ^fn=1.

Table 2. Sociodemographic, behavioural and gynecological history data from the study participants.

Population characteristics	Persistence n=73	Clearance n=31	p-value
Age†	28 (17-50)	26 (18-49)	0.95
Ethnicity*			0.17
White	34 (46.5%)	19 (61.2%)	
Non-white	39 (53.5%)	12 (38.8%)	
Marital status*			0.22
Married/living with partners	33 (45.2%)	10 (32.2%)	
Single	40 (54.8%)	21 (67.8%)	
Schooling†	11 (2-17)	11 (1-16)	0.65
Number of sex partners (1 year)†	1 (0-4)	1 (0-3)	0.63
Condom*			0.26
Yes	27 (36.9%)	8 (25.8%)	
No	46 (63.1%)	23 (74.2%)	
Hormonal contraceptive			0.36
Yes	52 (71.2%)	19 (61.3%)	
No	21 (28.8%)	12 (38.7%)	
Smoking*			0.66
Yes	48 (65.7%)	19 (61.2%)	
No	25 (34.3%)	12 (38.8%)	
Alcohol*			0.24
Yes	31 (42.4%)	17 (54.8%)	
No	42 (57.6%)	14 (45.2%)	
Drugs*			1.00
Yes	2 (2.8%)	1 (3.3%)	
No	70 (97.2%)	29 (96.7%)	
Complaints of abnormal discharge			0.50
Yes	46 (63%)	22 (70.1%)	
No	27 (37%)	9 (29.9%)	
<i>Trichomonas vaginalis</i>			0.55
Yes	3 (4.1%)	0 (0%)	
No	70 (95.9%)	31 (100%)	
<i>Chlamydia trachomatis</i>			0.27
Yes	8 (11%)	1 (3.2%)	
No	65 (89.0%)	30 (96.8%)	

* Chi-square or Fisher's exact test. $p < 0.05$ considered as significant.

† Mann-Whitney Test, expressed by median (minimum-maximum). $p < 0.05$ considered as significant.

Table 3. Features of vaginal microbiota evaluated from the total participants of the study, separated by the cervical infection outcome by HPV16 and/or HPV18.

	Persistence n=73	Clearance n=31	p-value
Microscopic classification (Nugent) &\$			0.20
Normal (scores 0 to 3)	31 (42.4%)	19 (61.2%)	
Intermediate (scores 4 to 6)	5 (6.8%)	1 (3.2%)	
Bacterial vaginosis (scores >6)	37 (50.8%)	11 (35.6%)	
Microscopic classification (Nugent-modified)&\$			0.09
Normal (scores 0 to 3)	32 (43.8%)	19 (61.2%)	
Intermediate + BV (scores >3)	41 (56.2%)	12 (38.8%)	
Positivity for <i>Gardnerella vaginalis</i> &*			0.04
Yes	57 (78.1%)	18 (58.1%)	
No	16 (21.9%)	13 (41.9%)	
Loads of <i>Gardnerella vaginalis</i> (number of copies/uL)†**	5.8E+02 (0 – 3.0E+05)	9.9E+01 (0 – 7.7E+04)	0.03
High <i>Gardnerella vaginalis</i> loads p>40&***			0.03
Yes	37 (50.7%)	8 (25.8%)	
No	36 (49.3%)	23 (74.2%)	
Positivity for GVSI gene&****			0.09
Yes	46 (63%)	14 (45.2%)	
No	27 (37%)	17 (54.8%)	

& Chi-square or Fisher's exact test. p<0,05 considered as significant.

† Mann-Whitney Test, expressed by median (minimum-maximum). p<0,05 considered as significant.

\$ Classification of the vaginal microbiota by Nugent et al. (1991).

*Positivity for *G. vaginalis* 23S rRNA gene. ** Quantification of *G. vaginalis* 23S rRNA gene. ***p40=526 number of copies/uL. ****Positivity for sialidase encoding gene of *G. vaginalis*.

References

1. Almonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, et al. Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(9):1654–63.
2. Hausen H zur. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 1996;1288(2):F55–78. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304419X96000200>
3. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V., et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518–27.
4. Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):3–13.
5. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621–32.
6. Ginindza TG, Dlamini X, Almonte M, Herrero R, Jolly PE, Tsoka-Gwegweni JM, et al. Prevalence of and associated risk factors for high risk human papillomavirus among sexually active women, Swaziland. *PLoS One*. 2017;12(1):1–18.
7. Bogani G, Taverna F, Lombardo C, Borghi C, Martinelli F, Signorelli M, et al. Retrospective study of the influence of HPV persistence on outcomes among women with high-risk HPV infections and negative cytology. *Int J Gynecol Obstet*. 2017;138(1):62–8.

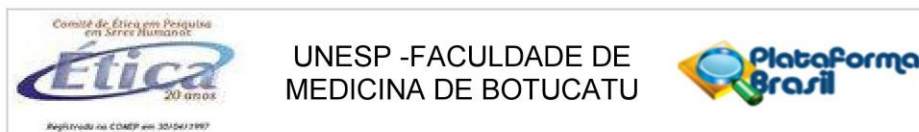
-
8. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: A population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2003;158(5):486–94.
 9. Gallo MF, Macaluso M, Warner L, Fleenor ME, Hook EW, Brill I, et al. Bacterial Vaginosis, Gonorrhea, and Chlamydial Infection Among Women Attending a Sexually Transmitted Disease Clinic: A Longitudinal Analysis of Possible Causal Links. *Ann Epidemiol.* 2012;22(3):213–20.
 10. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNairn D, Wabwire-Mangen F, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.* 1997;350(9077):546–50.
 11. Marconi C, Donders GG, Parada CMGL, Giraldo PC, Da Silva MG. Do *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* sp. and *Leptotrichia* sp. change the local innate immune response and sialidase activity in bacterial vaginosis? *Sex Transm Infect.* 2013;89(2):167–73.
 12. Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified “nonspecific” vaginitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1955;69(5):962–76.
 13. Schellenberg JJ, Jayaprakash TP, Gamage NW, Patterson MH, Vaneechoutte M, Hill JE. *Gardnerella vaginalis* subgroups defined by *cpn60* sequencing and sialidase activity in isolates from Canada, Belgium and Kenya. *PLoS One.* 2016;11(1):1–12.
 14. Varki A. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconj J.* 2009;26(3):231–45.

-
15. Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1253(1):16–36.
 16. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 2005;106(5):1013–23.
 17. Lewis WG, Robinson LS, Gilbert NM, Perry JC, Lewis AL. Degradation, foraging, and depletion of mucus sialoglycans by the vagina-adapted actinobacterium *Gardnerella vaginalis*. *J Biol Chem.* 2013;288(17):12067–79.
 18. Lewis WG, Robinson LS, Perry J, Bick JL, Peipert JF, Allsworth JE, et al. Hydrolysis of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin a (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. *J Biol Chem.* 2012;287(3):2079–89.
 19. Janulaitiene M, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauskiene A, Marcinkute A, et al. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups in women with and without bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):1–9.
 20. Hardy L, Jespers V, Van Bulck M Den, Buyze J, Mwambarangwe L, Musengamana V, et al. The presence of the putative *Gardnerella vaginalis* sialidase A gene in vaginal specimens is associated with bacterial vaginosis biofilm. *PLoS One.* 2017;12(2):1–11.
 21. Lopes Dos Santos Santiago G, Deschaght P, El Aila N, Kiama TN, Verstraelen H, Jefferson KK, et al. *Gardnerella vaginalis* comprises three distinct genotypes of which only two produce sialidase. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2011;204(5):450.e1-450.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2010.12.061>
 22. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of

-
- papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17–27.
23. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*. 2005;337(1):76–84.
 24. Shaw E, Ramanakumar A V., El-Zein M, Silva FR, Galan L, Baggio ML, et al. Reproductive and genital health and risk of cervical human papillomavirus infection: Results from the Ludwig-McGill cohort study. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;16(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1446-x>
 25. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol*. 1991;29(2):297–301.
 26. Marconi C, Duarte MTC, Silva DC, Silva MG. Prevalence of and risk factors for bacterial vaginosis among women of reproductive age attending cervical screening in southeastern Brazil. *Int J Gynecol Obstet* [Internet]. 2015;131(2):137–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.05.016>
 27. Di Paola M, Sani C, Clemente AM, Iossa A, Perissi E, Castronovo G, et al. Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>
 28. Arokiyaraj S, Seo SS, Kwon M, Lee JK, Kim MK. Association of cervical microbial community with persistence, clearance and negativity of Human Papillomavirus in Korean women: a longitudinal study. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33750-y>

-
29. van der Weele P, van Logchem E, Wolffs P, van den Broek I, Feltkamp M, de Melker H, et al. Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women. *J Clin Virol* [Internet]. 2016;83:6–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.020>
 30. Gillet E, Meys JFA, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: A meta-analysis. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2011;11(1):10. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/10>
 31. King CC, Jamieson DJ, Wiener J, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo AM, et al. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2011;2011.

6. Anexos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Quantificação cérvico-vaginal do gene codificante da sialidase de *Gardnerella vaginalis* e correlação com a taxa de clearance do Papilomavírus Humano em mulheres imunocompetentes.

Pesquisador: RAFAEL BELLETI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18750619.5.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Capes Coordenação Aperf Pessoal Nivel Superior
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.556.942

Apresentação do Projeto:

Mulheres com vaginose bacteriana (VB) têm risco aumentado para a infecção cervical do papilomavírus humano (HPV) e persistência do HPV, que predispõe ao maior risco de câncer uterino. *Gardnerella vaginalis* é a principal bactéria associada a vaginose bacteriana e também a principal fonte de sialidases bacterianas no ambiente cervicovaginal. *G. vaginalis* são produtoras de sialidase, responsável pela formação do biofilme vaginal, que dificulta o tratamento da VB. As sialidases são codificadas pelo gene *GVSI* em *G. vaginalis* e sua detecção foi recentemente proposta como um potencial marcador de persistência do HPV.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem por objetivo determinar a concentração de cópias do gene da sialidase de *Gardnerella vaginalis* no fluido cérvico-vaginal e correlacionar com a taxa de persistência da infecção pelo Papilomavírus Humano no período de 12 meses em mulheres imunocompetentes em idade reprodutiva. Para tanto, a casuística desse estudo será constituída por uma coorte de 287 mulheres incluídas no estudo prévio intitulado

"Prevalência de coinfeção e fatores associados ao Papilomavírus Humano (HPV) e à *Chlamydia trachomatis* em mulheres em idade reprodutiva atendidas em Programa de Prevenção de Câncer do Colo Uterino na região sudeste do Brasil" (CAAE: 34977014.0.0000.5411), cujo biorrepositório

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

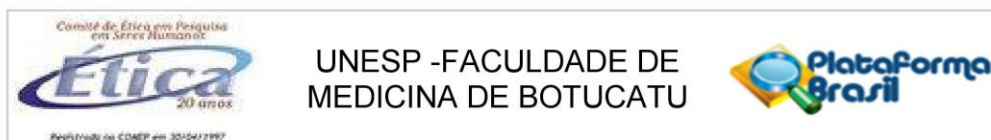
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.556.942

encontra-se formalmente regularizado (Parecer: 3.140.843). Na ocasião do referido estudo, sob coordenação da Prof^a. Dr. Márcia Guimarães da Silva, foram incluídas 1638 mulheres, atendidas nas Unidades Básica de Saúde de Botucatu, entre os anos de 2012 e 2013. Todas as mulheres assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O estudo compreendeu duas etapas: (a) um inquérito transversal para avaliar a prevalência de infecção pelo HPV e Chlamydia trachomatis; (b) um estudo de coorte para avaliar a influência da coinfeção por Chlamydia trachomatis sobre o clearance do HPV. Dentre as 1638 mulheres recrutadas, 545 (33.3%) foram positivas para a infecção pelo HPV. Para a constituição da coorte do presente estudo, foram considerados os seguintes critérios de exclusão: perda de seguimento após 12 meses (n=201) e presença de coinfeções genitais, como Trichomonas vaginalis (n=10) e Chlamydia trachomatis (n=47), o que reduziu de 545 mulheres para 287.

Por fim, nesse presente estudo, as mulheres serão divididas em dois grupos de estudo de acordo com o desfecho da infecção pelo HPV após 12 meses. De forma que o grupo (1) de mulheres com persistência de HPV será constituído por aquelas que apresentaram positividade para o mesmo genótipo de HPV no momento da inclusão do estudo e na visita de follow up após 12 meses (controle positivo). O grupo (2) de mulheres nas quais houve o clearance viral será composto por aquelas que apresentaram, após 12 meses, resultado negativo para a infecção pelo HPV detectado no momento da inclusão no estudo.

Critério de Inclusão:

Mulheres em idade reprodutiva, maiores de 18 anos, imunocompetentes, que seguiram o estudo desde o momento da inclusão até o follow up após 12 meses.

Critério de Exclusão:

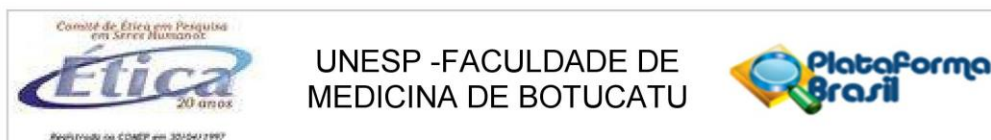
Mulheres menores de 18 anos, imunocomprometidas, presença de coinfeções (Chlamydia trachomatis e Trichomonas vaginalis) e fora da idade reprodutiva.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados. Quanto maiores e mais evidentes os riscos, maiores devem ser os cuidados para minimizá-los e a proteção oferecida pelo Sistema CEP/CONEP aos participantes. Devem ser analisadas possibilidades de danos imediatos ou posteriores, no plano individual ou coletivo. "

Riscos:

Endereço: Chácara Butignolli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609	E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.556.942

Os riscos são mínimos pois se limitam ao desconforto do exame ginecológico das amostras coletadas no estudo prévio "Prevalência de coinfeção e fatores associados ao Papilomavírus Humano (HPV) e à Chlamydia trachomatis em mulheres em idade reprodutiva atendidas em Programa de Prevenção de Câncer do Colo Uterino na região sudeste do Brasil" (CAAE: 34977014.0.0000.5411; Biorrepositório: 3.140.843).

Benefícios:

As mulheres no estudo tiveram diagnóstico e acompanhamento em relação a infecção pelo HPV, sendo devidamente acompanhadas pelas unidades de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa relevante e adequadamente (muito bem) elaborada. O pesquisador informa que haverá um custo de R\$ 9.500,00. Haverá financiamento da CAPES e Fapesp

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação adequada, foram apresentados todos os termos obrigatórios.

Os pesquisadores solicitam dispensa do TCLE por ser tratar de um estudo cuja casuística se constituirá de participantes recrutadas em estudo prévio "Prevalência de coinfeção e fatores associados ao Papilomavírus Humano(HPV) e à Chlamydia trachomatis em mulheres em idade reprodutiva atendidas em Programa de Prevenção de Câncer do Colo Uterino na região sudeste do Brasil" (CAAE: 34977014.0.0000.5411 / Parecer: 3.140.843), o TCLE já foi assinado pelas pacientes na ocasião da realização do estudo principal, que teve o recrutamento entre 2012 e 2013. Tendo em vista que a coleta do material biológico já foi finalizada nas Unidades Básica de Saúde participantes do estudo prévio, seria inviável a aplicação de um novo TCLE.

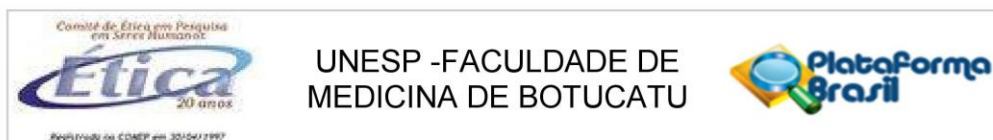
É importante ressaltar que o presente estudo tem por finalidade realizar análise complementares àquelas contempladas no estudo anterior, com o único fim de ampliar o entendimento das relações biológicas presentes no ambiente vaginal. Sendo assim, o presente estudo não trará qualquer consequência clínica e prática às participantes do estudo prévio, em virtude de possíveis dados gerados não apresentarem potencial de intervenção.

CRONOGRAMA: está coerente a brochura com a plataforma

Recomendações:

não há

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.556.942

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO ORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO ORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, realizada em 02/09/2019, o Projeto de Pesquisa encontra-se APROVADO.

O Projeto de Pesquisa deverá ser iniciado após aprovação do CEP.

Ao final da execução da Pesquisa, o Pesquisador deverá enviar o Relatório Final de Atividades, na forma de Notificação, via Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1106011.pdf	09/08/2019 11:50:27		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLEo.pdf	09/08/2019 11:49:12	RAFAEL BELLETI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDePesquisa.pdf	09/08/2019 11:46:23	RAFAEL BELLETI	Aceito
Parecer Anterior	CEP_HP.V.pdf	09/08/2019 11:45:10	RAFAEL BELLETI	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	09/08/2019 11:44:04	RAFAEL BELLETI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_RAFAEL.pdf	09/08/2019 11:32:39	RAFAEL BELLETI	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrep_HP.V.pdf	09/08/2019 11:26:25	RAFAEL BELLETI	Aceito
Declaração de	Anuencia_FMB.pdf	09/08/2019	RAFAEL BELLETI	Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

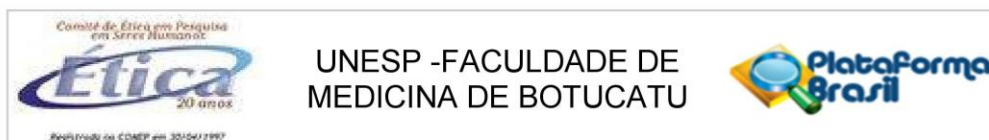
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.556.942

Instituição e Infraestrutura	Anuencia_FMB.pdf	11:25:13	RAFAEL BELLETI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aceite_UNIPEX.pdf	09/08/2019 11:24:44	RAFAEL BELLETI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 05 de Setembro de 2019

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
 (Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br