



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

Guilherme Ferrari Bevilacqua

Caracterização da microbiota vaginal em mulheres com lesões precursoras cervicais de alto grau submetidas à exérese em comparação com mulheres sem lesões e HPV não detectado

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

Orientador: Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto

Coorientadora: Profa. Assoc. Márcia Guimarães da Silva

**Botucatu
2026**

(Guilherme Ferrari Bevilacqua)

Caracterização da microbiota vaginal em mulheres com lesões precursoras cervicais de alto grau submetidas à exérese em comparação com mulheres sem lesões e HPV não detectado

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

Orientador: Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto

Coorientador: Profa. Assoc. Márcia Guimarães da Silva

Botucatu

2026

B571c Bevilacqua, Guilherme Ferrari
Caracterização da microbiota vaginal em mulheres com lesões precursoras cervicais de alto grau submetidas à exérese em comparação com mulheres sem lesões e HPV não detectado / Guilherme Ferrari Bevilacqua. -- Botucatu, 2026
53 f. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientador: Lucas Tadeu Bidinotto
Coorientadora: Márcia Guimarães Da Silva

1. Prevenção. 2. HPV. 3. Microbiota. 4. Disbiose. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Este projeto investigou a relação entre o HPV e a microbiota vaginal no contexto do desenvolvimento de lesões cervicais, um campo em ascensão na comunidade científica e de grande relevância para a saúde da mulher. A caracterização da composição microbiana associada ao estado de infecção viral visou auxiliar o melhor esclarecimento dos potenciais mecanismos que podem influenciar a infecção pelo vírus do HPV, ampliando o entendimento sobre fatores não virais que podem participar do desenvolvimento da displasia cervical. Do ponto de vista científico, os resultados fortalecem a base de conhecimento necessária para futuras estratégias de prevenção e tratamento mais personalizadas, integrando parâmetros microbiológicos ao acompanhamento clínico. O Brasil está em processo de transição do rastreamento do câncer do colo do útero da citologia para o teste molecular de HPV no SUS, o que aumentará substancialmente a detecção de casos. Nesse novo cenário, compreender como a microbiota vaginal se relaciona com a evolução da infecção é fundamental para auxiliar na estratificação de risco, orientar condutas clínicas e reduzir intervenções desnecessárias. Assim, este estudo não apenas gera conhecimento, mas também se alinha às novas demandas do SUS, contribuindo para melhorar a qualidade do cuidado oferecido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa científica, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Expresso minha profunda gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto e a pela minha co-orientadora, Profa. Assoc. Márcia Guimarães da Silva pela orientação dedicada, pelo rigor científico e pelas valiosas contribuições que guiaram cada etapa deste projeto e pelos ensinamentos e pelo apoio essencial ao longo desta trajetória acadêmica.

Aos meus familiares e amigos, agradeço pelo incentivo, pela compreensão e pelo suporte emocional que tornaram possível a conclusão deste meu mestrado.

Estendo meus agradecimentos ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) e ao NAP Prevenção do Hospital do Câncer de Barretos, pelo acolhimento e suporte técnico durante a execução deste estudo, bem como pela infraestrutura de excelência que possibilitou o desenvolvimento das inclusões e armazenamentos das amostras deste projeto. Agradeço ao Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal da UNIPEX, da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pelo apoio científico e pela colaboração indispensável nas etapas experimentais deste trabalho.

Por fim quero agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta pesquisa, deixo o meu mais sincero obrigado.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GUILHERME FERRARI BEVILACQUA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 26 de fevereiro de 2026, às 14h, no(a) Anfiteatro Prof. Emérito Antonio Carlos Cicogna (Bloco V) - Unipex - FM/Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GUILHERME FERRARI BEVILACQUA, intitulada "**Caracterização da microbiota vaginal em mulheres com lesões precursoras cervicais de alto grau submetidas à exérese em comparação com mulheres sem lesões e HPV não detectado**". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LUCAS TADEU BIDINOTTO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata, Profa. Dra. LARA TERMINI (Participação Virtual) do(a) Centro de Investigação Translacional em Oncologia / Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Profa. Dra. MICHELLE GARCIA DISCACCIATI DE CARVALHO (Participação Virtual) do(a) Departamento e Análises Clínicas e Toxicológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: **APROVADO** . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 LUCAS TADEU BIDINOTTO
Data: 03/03/2026 10:14:25-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. LUCAS TADEU BIDINOTTO

**Este estudo foi realizado com apoio da Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
Brasil – Processo nº 2024/02324-2**



RESUMO

O câncer do colo do útero (CCU) permanece como uma das principais causas de mortalidade entre mulheres em todo o mundo, especialmente em países de baixa e média renda, onde o acesso à vacinação e aos programas de rastreamento ainda são limitados. A infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco, particularmente pelo genótipo 16, é reconhecida como o principal fator etiológico do CCU. Nesse cenário, a microbiota vaginal tem sido apontada como um fator modulador relevante da infecção e persistência do HPV, influenciando o risco de desenvolvimento de lesões cervicais precursoras. Em condições de eubiose, observa-se a predominância do gênero *Lactobacillus*, responsável pela produção de ácido láctico, manutenção do pH vaginal ácido e proteção do epitélio cervical. Por outro lado, a disbiose vaginal, caracterizada pela perda dessa dominância e pelo aumento da diversidade microbiana, com prevalência de bactérias anaeróbias está associada à inflamação crônica, maior suscetibilidade à infecção pelo HPV e à persistência viral. A classificação da microbiota vaginal em Community State Types (CSTs) consolidou o estudo dessas comunidades bacterianas. O objetivo desta dissertação foi comparar o perfil da microbiota vaginal de mulheres com lesões cervicais precursoras de alto grau, no momento do tratamento excisional, com o de mulheres sem lesões cervicais submetidas ao exame preventivo, atendidas no Hospital do Câncer do Barretos. Durante o exame especular, foram coletadas amostras de conteúdo vaginal para análise microbiológica por coloração de Gram, visando à classificação em eubiose ou disbiose, e para análise molecular da microbiota por meio do sequenciamento da região V3–V4 do gene 16S rRNA, com posterior determinação dos perfis em CSTs. Foram incluídas 59 participantes, sendo 37 mulheres com lesão cervical de alto grau e HPV detectado e 22 mulheres controle, sem lesão e com HPV não detectado. Observou-se elevada frequência de disbiose vaginal em ambos os grupos, sem diferença estatisticamente significativa entre os perfis de CSTs. Esses achados reforçam a relevância da microbiota vaginal no contexto da infecção pelo HPV e indicam a necessidade de estudos futuros com maior aprofundamento na análise de táxons bacterianos específicos.

Palavras-chave: câncer do colo do útero; HPV; microbiota vaginal; disbiose

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) remains one of the leading causes of mortality among women worldwide, particularly in low- and middle-income countries, where access to vaccination and screening programs is still limited. Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HPV), especially genotypes 16 and 18, is recognized as the main etiological factor for cervical cancer. In this context, vaginal microbiota has emerged as a relevant modulating factor in HPV infection and persistence, influencing the risk of developing cervical precancerous lesions. Under eubiotic conditions, the vaginal microbiota is predominantly composed of the genus *Lactobacillus*, which is responsible for lactic acid production, maintenance of an acidic vaginal pH, and protection of the cervical epithelium. In contrast, vaginal dysbiosis, characterized by the loss of *Lactobacillus* dominance and increased microbial diversity with a higher prevalence of anaerobic bacteria, is associated with chronic inflammation, increased susceptibility to HPV infection, and viral persistence. The classification of the vaginal microbiota into Community State Types (CSTs) has consolidated the study of these bacterial communities. The aim of this dissertation was to compare the vaginal microbiota profile of women with high-grade cervical precancerous lesions at the time of excisional treatment with that of women without cervical lesions undergoing routine screening, attended at Hospital do Câncer de Barretos. During speculum examination, vaginal samples were collected for microbiological analysis using Gram staining to classify eubiosis or dysbiosis, and for molecular analysis of the microbiota through sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene, followed by the determination of CST profiles. A total of 59 participants were included, comprising 37 women with high-grade cervical lesions and detectable HPV infection and 22 control women without cervical lesions and with undetectable HPV. A high frequency of vaginal dysbiosis was observed in both groups, with no statistically significant differences between CST profiles. These findings reinforce the relevance of the vaginal microbiota in the context of HPV infection and highlight the need for future studies with deeper analysis of specific bacterial taxa.

Keywords: cervical cancer; HPV; vaginal microbiota; dysbiosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 - Gráfico CCU global.....	12
Figura 2 - Gráfico CCU Brasil.....	13
Figura 3 - Desenvolvimento CCU.....	16
Figura 4 - Neoplasia intraepitelial cervical.....	19
Figura 5 - Mecanismos protetores dos Lactobacilos.....	21
Figura 6 - Homeostase vaginal.....	23

Artigo Científico

Figura 1 – Heatmap da abundância relativa.....	44
Figura 2 - Alfa diversidade de Shannon.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados Sociodemográficos.....40

Tabela 2 - Dados Ginecológicos.....41

Tabela 3 - Resultados de Biópsia.....41

Tabela 4 - Resultados do Gram.....42

Tabela 5 - Community State Types (CSTs).....43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCU	Câncer do Colo do Útero
INCA	Instituto Nacional de Câncer
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ISTs	Infecções Sexualmente Transmissíveis
VLP	<i>Virus-like Particles</i>
pRb	Proteína do Retinoblastoma
CDKs	<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>
JEC	Junção Escamo-colunar
CIN	<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>
LSIL	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
HSIL	<i>High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
CAF	Cirurgia de Alta Frequência
LEEP	Loop Electrosurgical Excision Procedure
LLETZ	Large Loop Excision of the Transformation Zone
AMPs	<i>Antimicrobial Peptides</i>
VB	Vaginose Bacteriana
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
VA	Vaginose Aeróbia
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
CSTs	<i>Community State Types</i>

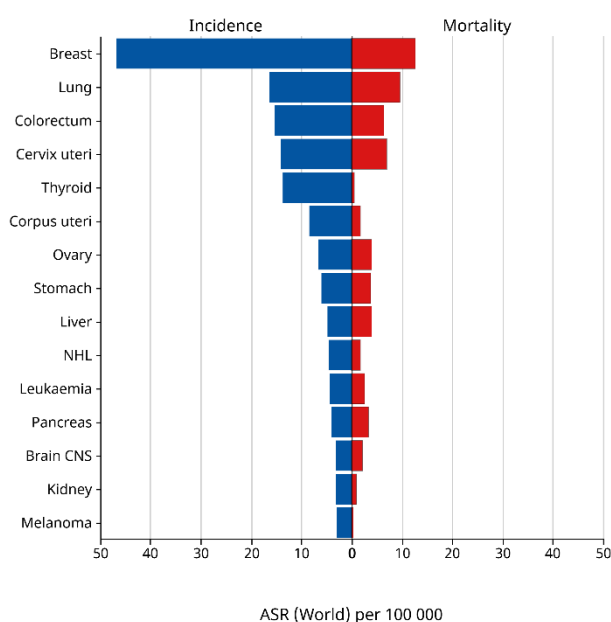
SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1	Referências Bibliográficas.....	26
2	ARTIGO CIENTÍFICO	30
2.1	RESUMO	31
2.2	INTRODUÇÃO	32
2.3	OBJETIVO	33
2.4	MÉTODOS	34
2.5	RESULTADOS	38
2.6	DISCUSSÃO	43
2.7	CONCLUSÃO	46
2.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
3	ANEXOS	51
3.1	ANEXO A – PARECER DO CEP HOSPITAL CÂNCER DE BARRETOS.....	51
3.2	ANEXO B – PARECER DO CEP FMB.....	52

1 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer do colo do útero (CCU) representa um dos principais problemas de saúde pública mundial, sendo a quarta neoplasia mais comum e terceira mais mortal entre mulheres, atrás apenas do câncer de mama, colorretal e de pulmão (1) (**Figura 1**). Estimativas globais sugerem que a maior concentração permanece nos países de baixa e média renda, onde o acesso a programas de rastreamento e vacinação ainda é limitado (1,2).

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence and Mortality, Females, in 2022
World
(Top 15 cancer sites)



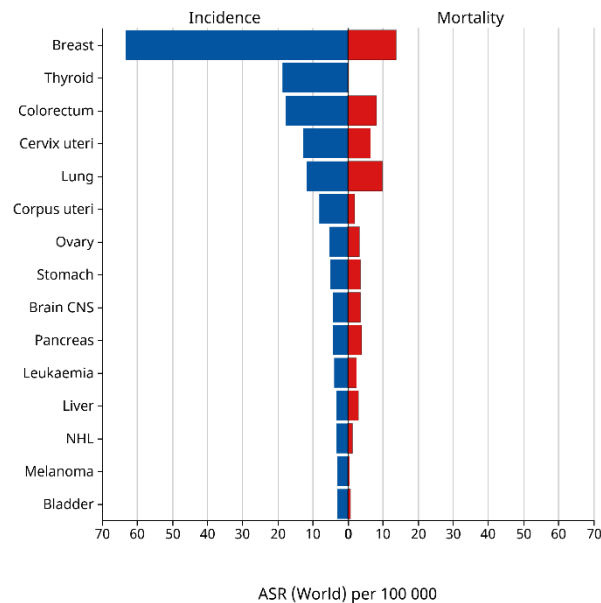
Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version : Globocan 2022 (version 1.1)
© All Rights Reserved 2025

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Figura 1: Incidência e a mortalidade mundial dos diferentes tipos de neoplasias em mulheres segundo a organização mundial da saúde. Fonte: Câncer Today – IARC (1)

No Brasil, o CCU está como a quarta neoplasia mais incidente e mortal entre mulheres, atrás apenas de mama, colorretal e tireoide (1) (**Figura 2**). Segundo as projeções do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o triênio de 2023 a 2025, estimou-se a ocorrência de aproximadamente 17 mil novos casos anuais, com taxas mais elevadas nas regiões Norte e Nordeste, refletindo diferenças no acesso a políticas de prevenção, diagnóstico precoce, tratamento e vacinação (3,4).

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence and Mortality, Females, in 2022
 Brazil
 (Top 15 cancer sites)



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
 Data version : Globocan 2022 (version 1.1)
 © All Rights Reserved 2025

International Agency
 for Research on Cancer
 World Health
 Organization

Figura 2: Incidência e mortalidade no Brasil dos diferentes tipos de neoplasias em mulheres segundo a organização mundial da saúde. Fonte: Câncer Today – IARC (1)

Um aspecto importante da epidemiologia do CCU é que se trata de uma neoplasia altamente prevenível, sendo que está diretamente relacionada à infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco, um fator de risco conhecido e passível de intervenção (3,5-7). Apesar disso, a doença ainda apresenta altos índices de incidência e mortalidade na população, o que demonstra falhas na implementação ou adesão às estratégias preventivas disponíveis, como vacinação e rastreamento (4,8). O diagnóstico muitas vezes ocorre em estágios avançados, o que reduz as chances de cura e aumenta a necessidade de tratamentos mais agressivos. Essa disparidade reforça que se trata de uma doença marcada por forte componente de desigualdade social e estrutural, sendo um tipo de câncer que pode ser prevenido com programas de vacinação bem estruturados como é visto em muitos países da Europa. No cenário internacional, países que conseguiram implementar programas de rastreamento organizados e vacinação em larga escala, têm apresentado queda consistente nas taxas de incidência e mortalidade. Esses exemplos evidenciam que

políticas públicas bem estruturadas são capazes de transformar o panorama desse tipo de neoplasia. No entanto, tais avanços ainda não foram universalizados, como na América Latina, África e sudeste Asiático, continuam a registrar um número de casos elevados se comparados a esses países. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu a meta 90–70–90, uma estratégia global para a eliminação do câncer do colo do útero como problema de saúde pública, propondo que 90% das meninas sejam vacinadas contra o HPV até os 15 anos, 70% das mulheres sejam rastreadas com testes de alta performance ao longo da vida, e 90% das mulheres diagnosticadas com lesões precursoras ou câncer recebam tratamento adequado até 2030 (2-6,8).

Entre todos os casos de CCU, mais de 90% estão associados à infecção pelo HPV. Embora mais de 218 genótipos já tenham sido descritos, apenas 45 infectam a região genital. Dentre esses apenas 12 são considerados de alto risco e estão diretamente relacionados à carcinogênese, sendo o tipo 16, em maior parte, o mais prevalente, responsáveis por aproximadamente 70% dos CCU e por praticamente todas as neoplasias induzidas por HPV em homens. Apesar da alta frequência das infecções por genótipos de alto risco, cerca de 80% delas são eliminadas pelo sistema imunológico em até três anos, atingindo o *clearance* viral, enquanto apenas cerca de 3% evoluem para CCU no intervalo de sete anos (9-11).

Os papilomavírus humanos pertencem à família Papillomaviridae e são considerados os agentes etiológicos das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) mais frequentes em nível mundial (11). Essas infecções podem variar desde quadros assintomáticos até manifestações clínicas como verrugas, além de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas. O HPV é um vírus não envelopado, com genoma constituído por DNA circular de fita dupla, onde as regiões E e L expressam oncoproteínas sendo elas E1, E2, E4, E5, E6, E7 e L1, L2 respectivamente. A proteína L1 é presente no capsídeo e tem papel na montagem da partícula viral, organizando-se em pentâmeros que formam a estrutura icosaédrica do vírus, que a torna altamente imunogênica, assim atua como *virus-like particle* (VLP), utilizado como imunizante para a produção da vacina contra o HPV. Este vírus possui tropismo por células do epitélio escamoso estratificado, iniciando seu ciclo infeccioso a partir da interação da proteína L2, com receptores celulares da camada basal epitelial. A proteína E1 é uma helicase viral essencial para a replicação do DNA do HPV, atuando na abertura da dupla hélice e permitindo a duplicação do genoma viral. A proteína E2 exerce função regulatória, controlando a transcrição dos genes virais e auxiliando a E1 na iniciação

da replicação, além de participar da manutenção do DNA viral em forma episomal. A proteína E4, expressa em fases mais tardias da infecção, está associada à diferenciação celular e à liberação viral, atuando na reorganização do citoesqueleto e facilitando a amplificação do genoma viral nas camadas superficiais do epitélio. Já a proteína E5 contribui para a persistência da infecção ao modular vias de sinalização celular, especialmente aquelas relacionadas a receptores de fatores de crescimento, favorecendo a proliferação celular e a evasão da resposta imune. As proteínas E6 e E7 são cruciais na oncogênese viral, promovendo a imortalização celular, induzindo a degradação das proteínas supressoras de tumor (p53) e proteínas do retinoblastoma (pRb), eventos que resultam em proliferação celular descontrolada e favorecem a transformação neoplásica. A proteína E6 exerce sua ação oncogênica principalmente na forma de um complexo com a ubiquitina-ligase celular, direcionando a p53 para degradação proteassomal. A perda de p53 compromete a capacidade da célula de interromper o ciclo celular frente a danos no DNA, de induzir reparo genômico ou de ativar vias apoptóticas, permitindo a sobrevivência e a proliferação de células geneticamente instáveis. Além disso, a E6 estimula a ativação da telomerase (hTERT), contribuindo para a imortalização celular, e interfere em proteínas envolvidas na polaridade celular e adesão, favorecendo a progressão tumoral. A proteína E7, por sua vez, atua predominantemente sobre o controle da transição da fase G1 para S do ciclo celular. A perda da função de pRb (junto com p107 e p130), resulta na liberação constitutiva de fatores de transcrição da família E2F, levando à ativação contínua de genes necessários para a síntese de DNA e proliferação celular, independentemente de sinais regulatórios fisiológicos. A E7 também interfere em inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), como p21 e p27, reforçando o descontrole do ciclo celular. A ação sinérgica de E6 e E7 cria um ambiente celular caracterizado por proliferação desregulada, resistência à apoptose, acúmulo de alterações genéticas e instabilidade cromossômica, entre muitos outros fatores, condições essenciais para a progressão de lesões intraepiteliais para carcinoma invasivo. A junção escamo-colunar (JEC) do colo do útero é a região de transição entre o epitélio colunar glandular do endocérvice e o epitélio escamoso do ectocérvice, local onde ocorre a metaplasia escamosa. Essa área é considerada altamente vulnerável à infecção pelo HPV, pois apresenta intensa atividade proliferativa e imaturidade celular, facilitando a penetração viral por meio de lesão epitelial. Além disso, o microambiente da JEC favorece a

persistência da infecção, tornando-a o principal sítio de origem para lesões precursoras e para o desenvolvimento do CCU (**Figura 3**). (5,6,10-12).

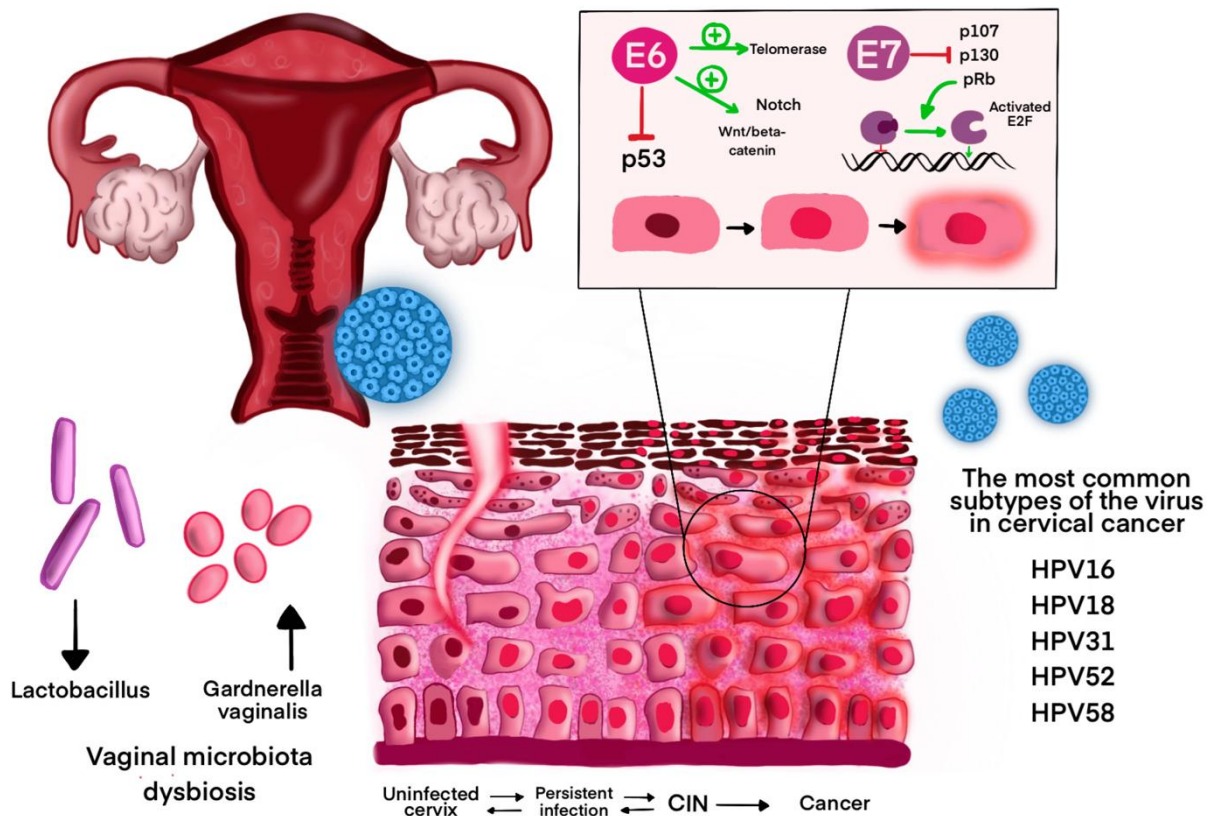


Figura 3: Mecanismo que leva ao desenvolvimento de CCU a partir da infecção pelo HPV. Após a infecção do epitélio, o vírus pode persistir devido a uma infecção crônica, levando a alterações pré-neoplásicas (CIN – *cervical intraepithelial lesions*) e, posteriormente, ao CCU. Fonte: Adaptada do artigo de Włoszek (2025).

A vacinação contra o HPV representa um dos maiores avanços na prevenção do CCU, sendo considerada o método mais eficaz para impedir a infecção inicial pelo vírus (8). No Brasil, o SUS disponibiliza gratuitamente a vacina quadrivalente, que protege contra os genótipos 6 e 11 (responsáveis por verrugas anogenitais) e 16 e 18 (13). Essa cobertura já trouxe impacto positivo na redução da circulação viral e na prevenção de lesões precursoras, reforçando a importância da imunização como política pública de saúde (7). Apesar disso, a vacina quadrivalente não contempla outros tipos de HPV de alto risco oncogênico, como os genótipos 31, 33, 45, 52 e 58, que também estão relacionados ao desenvolvimento do câncer cervical. Assim, mulheres vacinadas ainda permanecem sob risco de infecção por esses tipos de alto risco, especialmente em países como o Brasil, onde a diversidade genotípica do HPV

é elevada. Nesse sentido, a chegada da vacina nonavalente em outros contextos internacionais representa um avanço, mas ainda não está disponível de forma universal no SUS, o que cria um desafio para ampliar a proteção da população (4,7,13). Outro aspecto importante é o fato de que grande parte das mulheres adultas hoje não recebeu a vacina em idade recomendada, uma vez que, à época de sua adolescência, o imunizante ainda não estava disponível de forma gratuita pelo SUS. Muitas dessas mulheres estão atualmente em faixas etárias de maior risco para a persistência da infecção e para o desenvolvimento de lesões precursoras, permanecendo vulneráveis à ação do HPV. Esse cenário evidencia uma lacuna na cobertura vacinal e reforça a necessidade de estratégias complementares de prevenção e rastreamento. Além disso, mesmo entre as populações atualmente elegíveis para a vacinação, a adesão ainda é abaixo do ideal. Fatores como desinformação, estigma associado às infecções sexualmente transmissíveis, receios infundados sobre a segurança da vacina e dificuldades de acesso ao serviço de saúde contribuem para taxas de cobertura vacinal abaixo das metas estabelecidas. Esse quadro limita o impacto coletivo esperado da vacinação em termos de imunidade de rebanho e prolonga a circulação do vírus na população. Portanto, embora a vacinação seja o método mais eficaz e seguro de prevenção contra o HPV, ainda há importantes lacunas a serem preenchidas (4,7,14).

A infecção ativa pelo HPV pode ou não gerar alterações no epitélio cervical. O processo de transformação inicia-se quando a replicação viral dá lugar ao crescimento clonal de células transformadas, caracterizando um estado pré-neoplásico. Esse estágio é marcado pela ação das oncoproteínas virais, que promovem a proliferação celular e inibem a apoptose fisiológica. Em muitos casos, mesmo após o surgimento de lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions* – LSIL), o sistema imunológico é capaz de eliminar a infecção em até 24 meses. Entretanto, quando há persistência viral em células basais com baixa atividade replicativa, instala-se a fase de latência da infecção, na qual pode ocorrer transformação neoplásica progressiva, levando às lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesions* - HSIL), consideradas precursoras do CCU (9,15,16).

O rastreamento do câncer do colo do útero até o ano de 2025 foi baseado na citologia oncótica cervical, corada com Papanicolaou, exame de baixo custo e ampla aplicabilidade que possibilitou a redução significativa da mortalidade pela doença em

países que o adotaram de forma sistemática (3,6,7). O exame consiste na coleta de células do colo uterino para análise citomorfológica, com o objetivo de identificar alterações pré-neoplásicas antes da progressão para o câncer invasivo. Apesar de sua importância, a citologia apresenta limitações relacionadas à baixa sensibilidade e dependência de fatores técnicos e humanos, o que justifica a busca por métodos mais acurados (7,11). Quando a citologia identifica alterações celulares sugestivas de lesão intraepitelial, a paciente é encaminhada para colposcopia, exame que permite a visualização direta da mucosa cervical após aplicação de ácido acético e solução de Lugol, evidenciando áreas de metaplasia ou suspeitas de displasia. Nessas regiões, o colposcopista pode realizar biópsias dirigidas, as quais fornecem material histológico para confirmação diagnóstica. Esse procedimento constitui a etapa para definir a conduta clínica, permitindo diferenciar lesões de baixo e alto grau. A classificação de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) é definida como 1, 2 ou 3. Sendo NIC 1, o patologista identificou alterações morfológicas aproximadamente no terço inferior do epitélio do tecido da biópsia, onde existe baixa expressão de oncoproteínas E6 e E7; NIC 2 são identificadas alterações morfológicas em aproximadamente metade do epitélio do tecido, onde medianas expressões de E6 e E7 são encontradas; em NIC 3, por sua vez, são encontradas alterações morfológicas em praticamente todo o epitélio do tecido da biópsia, indicando elevada expressão de proteínas E6 e E7 (**Figura 4**). Nos casos em que a biópsia confirma a presença de NIC 2, 3 ou carcinoma *in situ*, a conduta terapêutica mais frequentemente indicada é o procedimento de excisão da zona de transformação, conhecido como CAF (Cirurgia de Alta Frequência, ou LEEP/LLETZ em nomenclaturas internacionais). Essa intervenção, realizada de forma ambulatorial, remove a área de transformação cervical onde o HPV exerce sua maior atividade oncogênica, sendo ao mesmo tempo diagnóstico e terapêutico, reduzindo o risco de progressão para o carcinoma invasivo (5,17-19).

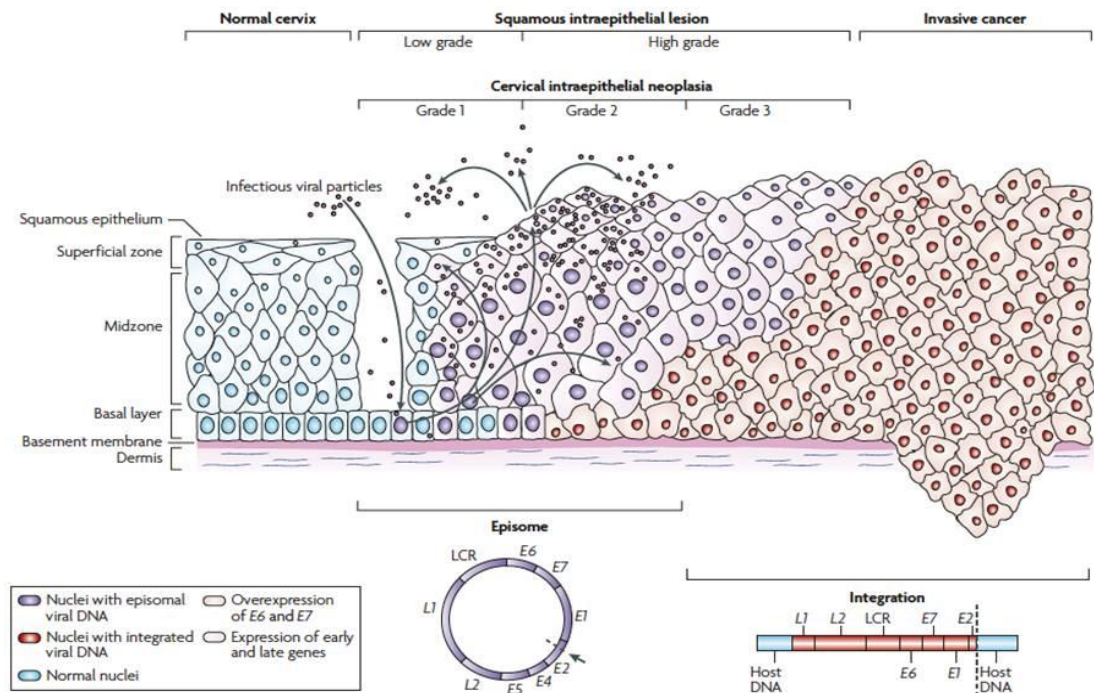


Figura 4: As células basais do epitélio cervical repousam sobre a membrana basal. O HPV acessa essas células basais por meio de lesão epitelial no epitélio cervical. Após a infecção, as oncoproteínas do HPV são expressas e o DNA viral se replica a partir do DNA episomal. Nas camadas superiores do epitélio (zona média e zona superficial) as proteínas L1 e L2 encapsidam os genomas virais para formar vírions progenitores no núcleo. O vírus liberado pode, então, iniciar uma nova infecção. A progressão de lesões não tratadas para câncer invasivo está associada à integração do genoma do HPV nos cromossomos do hospedeiro (núcleos vermelhos), com subsequente superexpressão dos oncogenes E6 e E7. Fonte: Adaptado do artigo de Woodman et. al. (2007).

A partir de 2025, as diretrizes Brasileiras de rastreamento iniciaram uma atualização, substituindo gradualmente a citologia convencional pelo teste molecular de DNA-HPV como método primário de triagem (7,11). O teste apresenta maior sensibilidade para a detecção de genótipos de alto risco oncogênico, permitindo identificar mulheres em risco antes do surgimento de alterações celulares detectáveis pela citologia. Essa mudança tende a aumentar a taxa de detecção precoce, especialmente em populações com acesso irregular ao rastreamento, ao mesmo tempo em que possibilita intervalos mais longos entre os exames para mulheres com resultados negativos. Essa transição tem impactos diretos tanto na prática clínica quanto na saúde pública. A detecção precoce de infecções por HPV de alto risco permitirá a identificação mais precisa de mulheres que necessitam de investigação

colposcópica, enquanto aquelas com resultados negativos poderão ser acompanhadas com maior segurança. Desta maneira, compreender fatores que influenciam a susceptibilidade a infecção do HPV e sua persistência viral e a progressão para lesões displásicas ganha ainda mais relevância nesse novo cenário, já que poderá auxiliar na estratificação de risco e no desenvolvimento de estratégias de prevenção personalizadas dentro do Sistema Único de Saúde (SUS) (11).

Existe uma gama de estudos que associam a microbiota vaginal aos fatores associados à infecção e ao *clearance* do HPV (5,6,20-27). A microbiota vaginal é composta por uma comunidade bacteriana na qual é esperada alta abundância relativa do gênero *Lactobacillus*. Esse ecossistema é modulado por fatores individuais de cada mulher, como ciclo menstrual, alimentação, níveis hormonais, imunodeficiências, práticas sexuais e coitarca precoce (28-31). A presença majoritária de *Lactobacillus spp.* é fundamental para a manutenção da homeostase local, uma vez que essas bactérias metabolizam como substrato o glicogênio epitelial, liberado pelas células escamosas, devido aos níveis de estrogênio, e produzem ácido láctico, promovendo a acidificação do pH vaginal (3,5-4,5). O ácido láctico além de manter o ambiente acidificado também é capaz de estimular a diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 12 e, ao mesmo tempo, promovem a liberação de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10. Este equilíbrio é fundamental para manter uma resposta imune adequada sem causar inflamação excessiva que poderia danificar os tecidos vaginais. O mesmo também promove a expressão de elafina pelas células epiteliais, uma proteína com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias que ajuda a manter a integridade cervical e dificulta outras infecções nas camadas basais do epitélio.

Os *Lactobacillus spp.* também produzem diversas outras moléculas de proteção como as bacteriocinas, que possuem efeito bactericida direto contra outras bactérias potencialmente patogênicas exercendo um papel imunomodulador importante. Os biossurfactantes, são moléculas que modificam a tensão superficial das células epiteliais, esta modificação interfere na capacidade de outras bactérias aderirem à parede vaginal, impedindo a formação de biofilmes e o crescimento excessivo de anaeróbios patogênicos: sem conseguir aderir adequadamente à mucosa, esses microorganismos potencialmente nocivos são mais facilmente eliminados do ambiente vaginal. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) inibe também o crescimento de bactérias patogênicas sendo um agente oxidante capaz de danificar

componentes essenciais das células microbianas, como proteínas, lipídios de membrana e ácidos nucleicos. A produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) oferece proteção aos tecidos epiteliais contra enzimas proteolíticas secretadas por patógenos, que se não fossem neutralizadas, poderiam degradar a integridade da barreira epitelial e facilitar a invasão de microorganismos patogênicos nos tecidos mais profundos. Em conjunto, todos esses mecanismos sugerem que os *Lactobacillus spp.* não apenas ocupam o nicho dentro da microbiota vaginal, mas ativamente criam e mantêm um ambiente hostil para patógenos através de múltiplas estratégias complementares, incluindo competição por nutrientes, produção de substâncias antimicrobianas, modificação do pH, modulação imune e fortalecimento das barreiras físicas e químicas naturais do trato genital feminino (**Figura 5**). Enquanto a baixa diversidade da microbiota intestinal está associada a condições prejudiciais, como inflamação crônica, obesidade e doenças metabólicas, no caso da microbiota vaginal o cenário é oposto. Nela, a predominância de poucas espécies, principalmente do gênero *Lactobacillus*, é considerada protetora, assim, enquanto no intestino a alta diversidade representa equilíbrio, no microambiente vaginal, a baixa diversidade é o estado ideal de saúde (28,32).

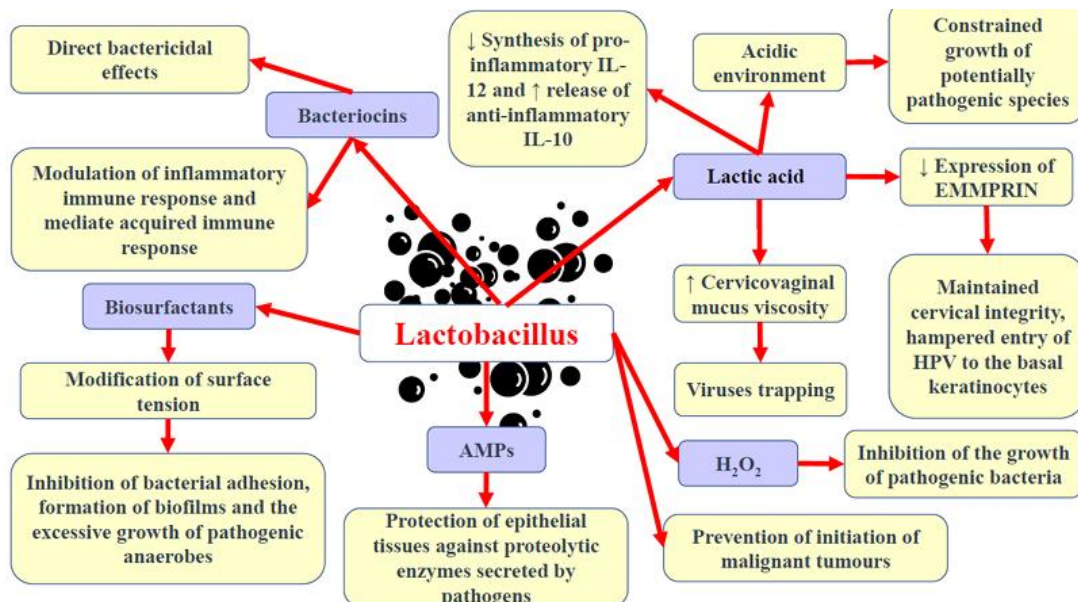


Figura 5: Diferentes mecanismos protetores causados pela alta abundância relativa de *Lactobacillus spp.* no trato genital feminino, como ácido láctico, bacteriocina, biossurfactantes, H_2O_2 e peptídeos antimicrobianos (AMPs - *antimicrobial peptide*). Fonte: Adaptado do artigo de Fraszczak et. al. (2022).

A disbiose da microbiota vaginal, caracterizada pela perda da dominância de *Lactobacillus spp.* e pela proliferação de espécies anaeróbicas, é reconhecida como o desequilíbrio microbiano mais comum em mulheres em idade reprodutiva (30,33,34). Essa condição leva à alteração do pH vaginal, que se torna menos ácido, favorecendo a colonização de bactérias oportunistas e dificultando a manutenção da homeostase local. A vaginose bacteriana (VB) representa a manifestação clínica mais frequente desse processo disbiótico, estando associada a maior risco de infecções sexualmente transmissíveis, complicações obstétricas e alterações cervicais de caráter pré-neoplásico (35,36). O diagnóstico da disbiose pode ser realizado utilizando a coloração de Gram em esfregaços de conteúdo vaginais para identificar diferentes morfotipos da microbiota vaginal (20,37-39). Essa classificação reflete um grau inicial de alteração da comunidade bacteriana e sua associação com risco aumentado para infecções virais e bacterianas (**Figura 6**).

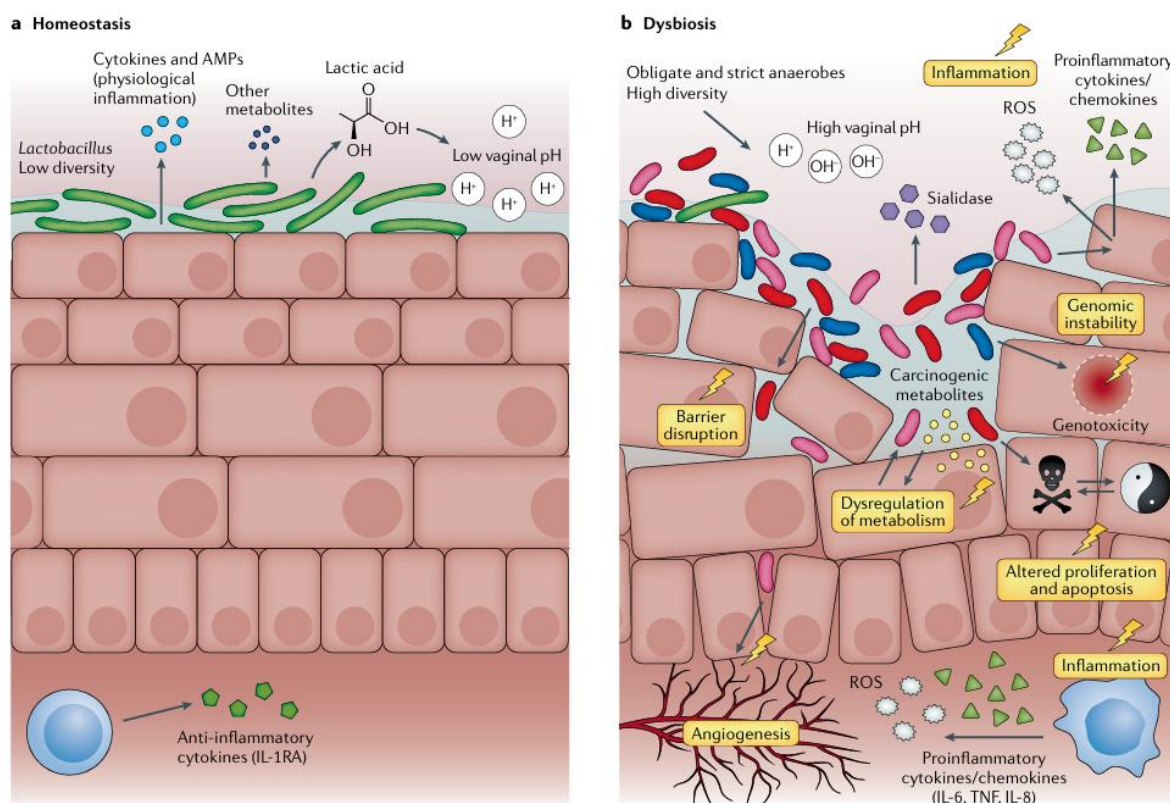


Figura 6: Representação da homeostase da microbiota vaginal quando possui baixa diversidade bacteriana e dominância em espécies de *Lactobacillus spp.* Por outro lado, na disbiose bacteriana, podem afetar características clássicas para progressão do CCU, incluindo inflamação crônica, ruptura

da barreira epitelial, instabilidade genômica, proliferação e/ou apoptose alteradas e angiogênese. Quando a disbiose ocorre, as espécies de *Lactobacillus spp.* são substituídas por uma mistura diversa de bactérias anaeróbias. Fonte: Adaptada do artigo de Łaniewsk et. al. (2020).

As bactérias mais frequentemente associadas à disbiose vaginal incluem *Gardnerella vaginalis*, espécie central na formação de biofilmes; *Fannyhessea vaginae*; *Prevotella spp.*; *Mobiluncus spp.*; e *Mycoplasma hominis* (21,31,40-43). Essas comunidades mistas contribuem para a redução de *Lactobacillus spp.* que diminuem a produção de ácido láctico e outros mecanismos protetores do ambiente vaginal. Como consequência, o microambiente torna-se mais permissivo à infecção pelo HPV, uma vez que, por algum motivo haja a perda da barreira fisiológica de camada de células, aumenta a exposição de receptores celulares das células basais a partículas virais, além de prolongar a persistência da infecção. Diversos estudos sugerem que a disbiose vaginal exerce papel importante na progressão para lesões intraepiteliais de alto grau (22,24,31,44-47). Isso ocorre porque o ambiente desbalanceado não apenas favorece a infecção e a persistência do HPV de alto risco oncogênico, como também induz um estado inflamatório crônico no epitélio cervical. Nessa condição, há aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , que atraem células imunes e promovem a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando estresse oxidativo e dano ao DNA epitelial. A resposta imune local frente à disbiose e à presença do HPV é marcada por intensa infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, que, embora participem da defesa contra patógenos, também contribuem para a degradação da matriz extracelular e para a remodelação tecidual. Além disso, o desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias compromete a regeneração epitelial, aumentando a vulnerabilidade do tecido a transformações neoplásicas. Esse cenário inflamatório persistente, associado à atividade das oncoproteínas virais E6 e E7, favorece a progressão de lesões pré-neoplásicas para carcinoma cervical invasivo (26,27,29).

Nesse sentido, a identificação da microbiota vaginal se faz importante para estudos subsequentes que possam associar táxons bacterianos a desfechos como *clearance* viral ou progressão de lesões. O sequenciamento do gene que codifica RNA ribossômico (rRNA) 16S consolidou-se como o método ouro para identificar os microrganismos presentes em amostras de diversos tipos de conteúdo, por possibilitar

a análise taxonômica mesmo de bactérias de difícil cultivo (16,30,48,49). O gene rRNA 16S está presente em todos os procariontes e desempenha papel essencial na estrutura e função do ribossomo bacteriano, o que explica seu elevado grau de conservação ao longo da cadeia evolutiva. Essa característica o torna primordial para estudos filogenéticos de identificação bacteriana. Intercaladas às regiões altamente conservadas, encontram-se nove regiões hipervariáveis (V1–V9), que apresentam variações de sequência suficientes para distinguir gêneros e, em muitos casos, espécies bacterianas. A amplificação dessas regiões específicas por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* universais direcionados às regiões conservadas adjacentes, possibilita a análise comparativa de comunidades bacterianas complexas. O sequenciamento das regiões hipervariáveis permite a construção de perfis taxonômicos detalhados da microbiota, fornecendo informações sobre composição, diversidade e abundância relativa dos microrganismos presentes na amostra. Em estudos da microbiota vaginal, essa abordagem é particularmente relevante, pois possibilita a identificação precisa de diferentes espécies de *Lactobacillus*, bem como de bactérias associadas a estados de disbiose, como VB ou Vaginose Aeróbia (VA), muitas das quais apresentam crescimento fastidioso ou são subdiagnosticadas por métodos baseados apenas em morfologia microscópica. Além disso, o uso do sequenciamento de nova geração (NGS) aplicado ao gene rRNA 16S permite a análise simultânea de muitas amostras com alta sensibilidade e reprodutibilidade, fornecendo uma visão abrangente da ecologia microbiana e das interações entre os diferentes táxons. Dessa forma, essa metodologia representa um avanço significativo em relação às técnicas tradicionais, constituindo um instrumento central para a compreensão das alterações da microbiota vaginal em condições fisiológicas e patológicas, bem como para a correlação dessas alterações com desfechos clínicos e biológicos. A aplicação desse método permitiu não apenas confirmar a classificação, mas também identificar subgrupos dentro deles. Além disso, esse tipo de análise viabiliza a construção de bancos de dados globais, permitindo comparações populacionais e fornecendo maior robustez estatística aos dados encontrados. O sequenciamento rRNA 16S é amplamente utilizado em outros contextos, como o estudo da microbiota intestinal, oral e cutânea. Essa versatilidade reforça a importância do método como ferramenta para compreender a interação entre microbiota e saúde (30,50,51).

Tendo essa importância da microbiota vaginal na manutenção da saúde da mulher, Ravel e colaboradores (2011), fizeram a caracterização da microbiota vaginal em *Community State Types* (CSTs) através do sequenciamento das regiões hipervariáveis V3-V4 do rRNA 16S que representou um avanço importante na compreensão do papel dos microrganismos no trato genital feminino (30). Essa classificação foi inicialmente proposta para organizar os diferentes perfis bacterianos encontrados, das diferentes comunidades que dominam a microbiota vaginal. Na CST I encontra-se um predomínio de *L. crispatus*, já na CST II de *L. gasseri*, na CST III por *L. iners*, na CST V há predomínio de *L. jensenii* e na CST IV possuem baixa abundância relativa de *Lactobacillus spp.* e aumento da diversidade bacteriana. Essa classificação possibilita correlacionar estados de eubiose, associados à proteção contra o HPV e outras infecções, com estados de disbiose, caracterizados por maior inflamação local e aumento do risco de persistência viral e desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (16,25,45,47-49,52,53).

Achados de Audirac et al. (2016) mostraram que a composição da microbiota vaginal varia conforme a progressão para lesões intraepiteliais cervicais, transitando de comunidades CST I, em mulheres HPV-negativas sem lesões, para CST IV em pacientes com diagnóstico de NIC 2/3, com aumento de *Sneathia spp.* e predominância de *Fusobacterium spp.*, incluindo *F. necrophorum*, em casos de câncer cervical (54). Esses resultados corroboram os achados de Łaniewski et al. (2018), que demonstraram associação entre a infecção persistente por HPV, a presença de lesões cervicais e perfis de disbiose vaginal caracterizados por maior abundância de *Gardnerella vaginalis*, *Fannyhessea vaginae*, *Sneathia spp.* e outras bactérias anaeróbias, além de maior diversidade microbiana. A presença constante de bactérias anaeróbicas em mulheres com diagnóstico de neoplasia intraepitelial tem sido reportada em diversos estudos (55). Nesse sentido, Kyrgiou et al. (2017) reforçam que, embora a infecção persistente por HPV oncogênico seja necessária para o desenvolvimento do CCU, não é suficiente por si só, sendo a microbiota vaginal um modulador fundamental na resposta imune a essa patologia. Evidências de sequenciamento de nova geração mostram que mulheres com HPV detectado apresentam maior diversidade microbiana e menor abundância de *Lactobacillus spp.* em comparação às HPV não detectado, favorecendo a persistência viral, especialmente em perfis de disbiose como CST IV (45). Brotman et al. (2014) demonstraram ainda que o tabagismo está fortemente associado a alterações da

microbiota, com redução de *Lactobacillus spp.* e maior prevalência de CST IV. Mulheres tabagistas apresentaram risco 25 vezes maior de estarem nesse perfil, além de exibirem escores de Nugent mais elevados e pH vaginal aumentado, ambos indicativos de vaginose bacteriana (48). De forma semelhante, Musa et al. (2023) relataram que mulheres nigerianas com microbiota classificada como CST III ou CST IV apresentaram maior associação com lesões de alto grau e câncer cervical invasivo. O estudo também evidenciou que a coinfeção pelo HIV aumenta significativamente a progressão, reforçando o impacto da imunossupressão (53). Estudos como os de Al Kassa et al. (2014) e, mais recentemente, Fraszczak et al. (2022), sugerem que essa diferença talvez esteja relacionada à conformação do carbono quiral no ácido láctico produzido pelos *Lactobacillus*. Enquanto *L. crispatus* (CST I) produz tanto L- quanto D-ácido láctico, *L. iners* (CST III) produz apenas L-ácido láctico, sendo este menos protetor, uma vez que a conformação D- exerce efeito mais potente na proteção contra a persistência viral (28,32).

O conhecimento detalhado sobre quais espécies bacterianas estão associadas a proteção ou risco de infecção pode orientar o uso de probióticos específicos, moduladores da resposta imune ou até tratamentos antimicrobianos personalizados. Além disso, a criação de modelos preditivos sobre o risco de persistência de HPV em determinadas pacientes pode auxiliar na tomada de decisão clínica e no direcionamento de protocolos preventivos mais eficazes, auxiliando assim a meta 90-70-90 definida pela OMS.

1.1 Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. Cancer Today [Internet]. 2025 [citado 16 de setembro de 2025]. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&sexes=2&age_end=12&group_populations=1&types=0_1&sort_by=value1
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 15 de agosto de 2021;149(4):778–89.
3. LUNA DF. Desigualdades regionais na adesão ao exame Papanicolau para rastreamento do câncer do colo do útero e fatores associados: uma análise com dados da pesquisa nacional de saúde 2019. 2025.
4. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. [Internet]. 2023 [citado 28 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>
5. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. Vol. 7, *Nature Reviews Cancer*. 2007. p. 11–22.
6. Włoszek E, Krupa K, Skrok E, Budzik MP, Deptała A, Badowska-Kozakiewicz A. HPV and Cervical Cancer-Biology, Prevention, and Treatment Updates. Vol. 32, *Current Oncology*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Rastreamento do Câncer do Colo do Útero (Diretriz Brasileira) [Internet]. 2025 [citado 16 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/pcdt/r/rastreamento-cancer-do-colo-do-utero/view>
8. Yousefi Z, Aria H, Ghaedrahmati F, Bakhtiari T, Azizi M, Bastan R, et al. An Update on Human Papilloma Virus Vaccines: History, Types, Protection, and Efficacy. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
9. Hammer A, Demarco M, Campos N, Befano B, Gravitt PE, Cheung L, et al. A study of the risks of CIN3+ detection after multiple rounds of HPV testing: Results of the 15-year cervical cancer screening experience at Kaiser Permanente Northern California. *Int J Cancer*. 15 de setembro de 2020;147(6):1612–20.
10. Demarco M, Hyun N, Carter-Pokras O, Raine-Bennett TR, Cheung L, Chen X, et al. A study of type-specific HPV natural history and implications for contemporary cervical cancer screening programs. *EClinicalMedicine*. 1o de maio de 2020;22.
11. Arroyo Mühr LS, Eklund C, Lagheden C, Correa RM, Fellner MD, Picconi MA, et al. The Human Papillomavirus (HPV) Laboratory e-Manual: A comprehensive guide for HPV testing and research. *Journal of Clinical Virology*. 1o de agosto de 2025;179.
12. Yu L, Majerciak V, Zheng ZM. HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
13. Brasil. Ministério da Saúde. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hpv>. 2021 [citado 2 de outubro de 2025]. HPV. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hpv>
14. Brasil. Ministério da Saúde. Fake news sobre vacinas: entenda os perigos da desinformação [Internet]. 2025 [citado 2 de outubro de 2025]. Disponível em: Fake news sobre vacinas: entenda os perigos da desinformação

15. Brouwer AF, Campredon LP, Walline HM, Marinelli BM, Goudsmit CM, Thomas TB, et al. Incidence and clearance of oral and cervicogenital HPV infection: longitudinal analysis of the MHOC cohort study. *BMJ Open*. 3 de janeiro de 2022;12(1):e056502.
16. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Tracy JK, Zenilman JM, Ravel J, et al. Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection. *Journal of Infectious Diseases*. 1o de dezembro de 2014;210(11):1723–33.
17. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*. 23 de outubro de 2007.
18. Carvalho NS de, Rodrigues IT, Bicudo SR, Barbosa LS, Franco AR do N e S. Colposcopia na prática clínica: fundamentos, técnicas e achados diagnósticos. *Revista Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior [Internet]*. 16 de setembro de 2025;9(1):18. Disponível em: <https://rbptgi.emnuvens.com.br/revista/article/view/116>
19. Lapin GA, Fm Derchain S, Tambascia J. Oncologic colpocytology collected in the public health and reference services in the diagnostic of the severity of intraepithelial cervical lesion [Internet]. 2000. Disponível em: www.fsp.usp.br/rsp
20. Lin W, Zhang Q, Chen Y, Dong B, Xue H, Lei H, et al. Changes of the vaginal microbiota in HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional analysis. *Sci Rep*. 1o de dezembro de 2022;12(1).
21. Łaniewski P, İlhan ZE, Herbst-Kralovetz MM. The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy. *Nature Reviews Urology*. Nature Research; 2020.
22. Brusselaers N, Shrestha S, van de Wijgert J, Verstraeten H. Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis. Vol. 221, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2019. p. 9-18.e8.
23. Mancilla V, Jimenez NR, Bishop NS, Flores M, Herbst-Kralovetz MM. The Vaginal Microbiota, Human Papillomavirus Infection, and Cervical Carcinogenesis: A Systematic Review in the Latina Population. *J Epidemiol Glob Health*. 1o de junho de 2024;14(2):480.
24. Wei B, Chen Y, Lu T, Cao W, Tang Z, Yang H. Correlation between vaginal microbiota and different progression stages of cervical cancer. *Genet Mol Biol*. 2022;45(2).
25. Molina MA, Coenen BA, Leenders WPJ, Andralojc KM, Huynen MA, Melchers WJG. Assessing the Cervicovaginal Microbiota in the Context of hrHPV Infections: Temporal Dynamics and Therapeutic Strategies, *mBio*. American Society for Microbiology; 2022.
26. De Seta F, Campisciano G, Zanotta N, Ricci G, Comar M. The Vaginal Community State Types Microbiome-Immune Network as Key Factor for Bacterial Vaginosis and Aerobic Vaginitis. *Front Microbiol*. 30 de outubro de 2019;10.
27. Caselli E, D'Accolti M, Santi E, Soffritti I, Conzadori S, Mazzacane S, et al. Vaginal Microbiota and Cytokine Microenvironment in HPV Clearance/Persistence in Women Surgically Treated for Cervical Intraepithelial Neoplasia: An Observational Prospective Study. *Front Cell Infect Microbiol*. 5 de novembro de 2020;10.
28. Frąszczak K, Barczyński B, Kondracka A. Does *Lactobacillus* Exert a Protective Effect on the Development of Cervical and Endometrial Cancer in Women? *Cancers (Basel)*. 7 de outubro de 2022;14(19):4909.
29. Zhou ZW, Long HZ, Cheng Y, Luo HY, Wen DD, Gao LC. From Microbiome to Inflammation: The Key Drivers of Cervical Cancer. *Front Microbiol*. 15 de novembro de 2021;12.

30. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 15 de março de 2011;108(supplement_1):4680–7.
31. Gardella B, Pasquali MF, La Verde M, Cianci S, Torella M, Dominoni M. The Complex Interplay between Vaginal Microbiota, HPV Infection, and Immunological Microenvironment in Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Literature Review. *Int J Mol Sci*. 28 de junho de 2022;23(13):7174.
32. Al Kassaa I, Hober D, Hamze M, Chihib NE, Drider D. Antiviral Potential of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 1o de dezembro de 2014.
33. Piyathilake CJ, Ollberding NJ, Kumar R, Macaluso M, Alvarez RD, Morrow CD. Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses. *Cancer Prevention Research*. 1o de maio de 2016;9(5):357–66.
34. Ventolini G, Vieira-Baptist P, De Seta F, Verstraelen H, Lonnee-Hoffman R, Lev-Sagi A. The Vaginal Microbiome: IV. The Role of Vaginal Microbiome in Reproduction and in Gynecologic Cancers. Vol. 26, *Journal of Lower Genital Tract Disease*. Lippincott Williams and Wilkins; 2022.
35. Guo Y I, You K, Qiao J, Zhao Y m, Geng L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *Int J STD AIDS*. 1o de agosto de 2012;23(8):581–4.
36. 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;2011:1–8.
37. Abou Chacra L, Fenollar F, Diop K. Bacterial Vaginosis: What Do We Currently Know? Vol. 11, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
38. Cibley LJ, Cibley LJ. Cytolytic vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165(4):1245–9.
39. Nugent, RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation [Internet]. Vol. 29, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1991. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
40. 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*. 31 de agosto de 2017;7(1):10200.
41. Chen Y, Qiu X, Wang W, Li D, Wu A, Hong Z, et al. Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia progression are associated with increased vaginal microbiome diversity in a Chinese cohort. *BMC Infect Dis*. 26 de dezembro de 2020;20(1):629.
42. Liu J, Luo M, Zhang Y, Cao G, Wang S. Association of high-risk human papillomavirus infection duration and cervical lesions with vaginal microbiota composition. *Ann Transl Med*. setembro de 2020;8(18):1161–1161.
43. Shi W, Zhu H, Yuan L, Chen X, Huang X, Wang K, et al. Vaginal microbiota and HPV clearance: A longitudinal study. *Front Oncol*. 24 de outubro de 2022;12.
44. Norenhag J, Du J, Olovsson M, Verstraelen H, Engstrand L, Brusselaers N. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis. *BJOG*. 17 de janeiro de 2020;127(2):171–80.
45. Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki AB. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Translational Research*. janeiro de 2017;179:168–82.
46. Wu S, Ding X, Kong Y, Acharya S, Wu H, Huang C, et al. The feature of cervical microbiota associated with the progression of cervical cancer among reproductive females. *Gynecol Oncol*. novembro de 2021;163(2):348–57.

47. Molina MA, Andralojc KM, Huynen MA, Leenders WPJ, Melchers WJG. In-depth insights into cervicovaginal microbial communities and hrHPV infections using high-resolution microbiome profiling. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 28 de setembro de 2022;8(1):75.
48. Brotman RM, He X, Gajer P, Fadrosch D, Sharma E, Mongodin EF, et al. Association between cigarette smoking and the vaginal microbiota: a pilot study. *BMC Infect Dis*. 28 de dezembro de 2014;14(1):471.
49. France MT, Ma B, Gajer P, Brown S, Humphrys MS, Holm JB, et al. VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. *Microbiome*. 1o de dezembro de 2020;8(1).
50. Wang Q, Cole JR. Updated RDP taxonomy and RDP Classifier for more accurate taxonomic classification. *Microbiol Resour Announc*. 11 de abril de 2024;13(4).
51. Anderson Da Silva M. Desenvolvimento Biotecnológico de Kit para Análise da Microbiota Intestinal. 2024.
52. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep*. 17 de novembro de 2015;5(1):16865.
53. Musa J, Maiga M, Green SJ, Magaji FA, Maryam AJ, Okolo M, et al. Vaginal microbiome community state types and high-risk human papillomaviruses in cervical precancer and cancer in North-central Nigeria. *BMC Cancer*. 20 de julho de 2023;23(1):683.
54. Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Téllez-Sosa J, Martínez-Barnetche J, Cortina-Ceballos B, et al. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS One*. 26 de abril de 2016;11(4):e0153274.
55. Łaniewski P, Barnes D, Goulder A, Cui H, Roe DJ, Chase DM, et al. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women. *Sci Rep*. 15 de maio de 2018;8(1):7593.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Caracterização da microbiota vaginal em mulheres com lesões precursoras cervicais de alto grau submetidas à exérese em comparação com mulheres sem lesões e HPV não detectado

Autores: Guilherme Ferrari Bevilacqua¹, Karen Cristina Borba Souza¹, Júlio César Possati-Resende⁴, Márcio Antoniazzi⁴, Bruno de Oliveira Fonseca⁴, Suelen Cristina Tesoni⁴, Ana Carolina Sprocatti¹, Luiza Zanini Caram Sfair¹, Jeniffer Sena Baptista Ferreira¹, Mariana de Castro Silva¹, Amanda Montezano Cintra⁶, Nathalia Mayumi Noda Nicolau⁶, Camila Marconi⁵, Márcia Guimarães da Silva¹, Lucas Tadeu Bidinotto^{1, 2, 3}

¹Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brasil.

²Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Hospital do Câncer do Barretos, Barretos, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Biologia Humana e Experimental, Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata – FACISB, Barretos, São Paulo, Brasil.

⁴Departamento de Prevenção, Hospital do Câncer do Barretos, Barretos, São Paulo, Brasil.

⁵Setor de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

⁶Laboratório Central Multiusuário, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brasil.

Autores correspondentes:

Guilherme Ferrari Bevilacqua

Aluno de Mestrado

Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular – Hospital do Câncer de Barretos

Rua Antenor Duarte Villela, 1331 – Barretos, São Paulo, CEP 14784-400, Brasil

E-mail: guilherme.fbev@gmail.com

ORCID: 0000-0002-3992-9218

Lucas Tadeu Bidinotto

Professor Assistente

Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular – Hospital do Câncer de Barretos

Rua Antenor Duarte Villela, 1331 – Barretos, São Paulo, CEP 14784-400, Brasil

Tel.: +55 (17) 3321-6600 – Ramal 7350

E-mail: lucasbidinotto@gmail.com

ORCID: 0000-0002-6909-8347

2.1 RESUMO

Introdução: O câncer do colo do útero (CCU) tem como principal causa a infecção persistente por HPV de alto risco. No entanto, os mecanismos associados ao *clearance* ou persistência da infecção por HPV continuam pouco entendidos e parecem ser multifatoriais, sendo que eventuais fatores protetores da microbiota lactobacilar estejam associados. **Objetivo:** Comparar o perfil da microbiota vaginal de mulheres com lesões precursoras cervicais de alto grau, no momento do tratamento excisional, com o de mulheres submetidas ao exame preventivo, atendidas no Hospital do Câncer de Barretos. **Métodos:** Durante o exame especular, foi coletado conteúdo vaginal para análise microbiológica após coloração de Gram, para determinação de eubiose e disbiose. Adicionalmente, foi coletado conteúdo para análise molecular da microbiota através do sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S e determinação dos perfis em *Community State Types* (CSTs). **Resultados:** Foram incluídas 59 participantes de pesquisa. Dessas, 37 são pacientes que foram submetidas a exérese da lesão cervical de alto grau e HPV detectado (G2) e 22 eram pacientes controle, sem lesão, HPV não detectado (G1). Considerando G2, 86,5% foram diagnosticadas como NIC3 e 13,5% como NIC2. O genótipo do HPV mais prevalente foi o HPV 16 em 45,9%. Houve elevada frequência de VB observada (G1: 36,4%; G2: 48,6%; $p = 0,373$) assim tendo uma disbiose predominante na coorte estudada. Este estudo não encontrou significância estatística na diferenciação entre os perfis CSTs ($p = 0,950$), porém mostrou em nossa coorte que em ambos os grupos as participantes de pesquisa se encontravam na maioria no perfil CST IV (G1: 36,4%; G2: 29,7%) ou CST III (G1: 31,8%; G2: 37,8%) perfis associados a disbiose bacteriana e maior susceptibilidade a infecção e persistência do vírus do HPV. **Conclusão:** Estudos mais aprofundados são necessários a partir deste, em que táxons bacterianos específicos devem ser comparados entre os diferentes grupos de pacientes.

Palavras-chave: câncer do colo do útero; HPV; microbiota vaginal; disbiose.

2.2 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero (CCU) representa um dos principais problemas de saúde pública mundial, sendo a quarta neoplasia mais comum e terceira mais mortal entre mulheres, atrás apenas do câncer de mama, colorretal e de pulmão (1). No Brasil, o CCU está como a quarta neoplasia mais incidente e mortal entre mulheres, atrás apenas de mama, colorretal e tireoide (1,2).

A etiologia dessa neoplasia está fortemente associada à infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco, reconhecidos como os principais agentes na progressão para lesões precursoras e carcinoma invasivo (3-5). A infecção ocorre principalmente na camada basal do epitélio cervical, onde as proteínas virais E6 e E7 promovem proliferação celular e inibem a diferenciação, facilitando o desenvolvimento de displasias cervicais. A junção escamocolumnar (JEC) é considerada a região mais vulnerável à infecção, sendo o local de origem de mais de 90% das neoplasias do trato genital inferior. Existem diversos fatores que influenciam a persistência viral, como imunossupressão, tabagismo, multiparidade e uso prolongado de contraceptivos orais (6). Ainda assim, a maioria das infecções é autolimitada. No entanto, uma fração pode evoluir para lesões intraepiteliais de alto grau (NIC 2/3) e eventualmente para carcinoma invasivo, em decorrência de uma resposta imune ineficiente (7-9).

Nos últimos anos, estudos têm evidenciado que a composição da microbiota vaginal pode influenciar a infecção e a persistência do HPV (6,10-16). Em condições de eubiose, a microbiota é dominada por espécies do gênero *Lactobacillus*, que atuam na manutenção do microambiente vaginal por meio da produção de ácido lático, que reduz o pH (<4,5), da liberação de peptídeos antimicrobianos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, e produzem biosurfactantes que dificultam a adesão bacteriana, formação de biofilmes e a invasão viral. A disbiose vaginal é caracterizada pela redução de *Lactobacillus spp.* e aumento da diversidade bacteriana, com predomínio de anaeróbios, o que induz uma resposta pró-inflamatória local. Esse processo pode causar danos epiteliais e facilitar tanto a entrada quanto a persistência do HPV. Estudos demonstram que mulheres com lesões precursoras e câncer cervical apresentam aumento da diversidade microbiana e redução da abundância relativa de

Lactobacillus spp., acompanhada de maior presença dos gêneros *Prevotella*, *Megasphaera*, *Gardnerella* e *Fannyhessea* (17-19).

Nesse contexto, Ravel e colaboradores (2011) propuseram uma classificação da microbiota vaginal em *Community State Types* (CSTs), baseada nas populações bacterianas identificadas pelo sequenciamento das regiões V3-V4 do gene que codifica o rRNA 16S (20). Essa classificação define cinco perfis principais: CST I, dominado por *Lactobacillus crispatus*; CST II, por *L. gasseri*; CST III, por *L. iners*; CST V, dominado por *L. jensenii* e CST IV, caracterizado por baixa abundância de *Lactobacillus spp.* e elevada diversidade bacteriana. Diversos trabalhos apontam que o aumento da diversidade bacteriana e prevalência de CST IV em casos de lesões de baixo e alto grau, além do câncer invasivo, associando esse perfil à infecção e persistência viral. Por outro lado, o CST II foi relacionado a maior *clearance* de HPV em lesões NIC I e II, enquanto a prevalência de CST I diminui proporcionalmente à severidade da doença, sendo associada à menor inflamação vaginal. CST V também apresenta baixa frequência em mulheres HPV positivas. Já o CST III, dominado por *L. iners*, tem sido associado negativamente ao *clearance* viral e apresenta maior tendência à transição para microbiotas não lactobacilares. Interessantemente, esse perfil, juntamente com o CST IV, é frequentemente observado em mulheres após exérese de lesões precursoras, sugerindo sua possível relação com o risco de recorrência (12,13,21-27).

Portanto, a caracterização do perfil de microbiota em mulheres com lesões pré-neoplásicas e a comparação com mulheres sem lesão, HPV não detectado, se faz importante, já que a elucidação do papel desta microbiota na infecção ou *clearance* do HPV pode levar a importantes desfechos considerando a evolução para lesões neoplásicas.

2.3 OBJETIVO

Caracterizar a microbiota vaginal de mulheres com alterações displásicas de alto grau no colo do útero no momento do tratamento excisional, e comparar com mulheres sem lesão e com HPV não detectado.

2.4 MÉTODOS

Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo observacional transversal, no qual mulheres diagnosticadas com lesões precursoras de alto grau e encaminhadas para tratamento excisional no departamento de Prevenção de Câncer do Hospital do Câncer de Barretos foram pareadas, com os critérios de idade (± 5 anos) e tabagismo, com mulheres que procuraram o setor de prevenção do Hospital do Câncer de Barretos para coleta do Papanicolaou. Essas participantes de pesquisa foram recrutadas e distribuídas em dois grupos:

G1 - Grupo controle, que consiste em 22 mulheres com exame citopatológico normal e HPV não detectado;

G2 - Grupo com exérese de lesão precursora, que consiste em 37 mulheres com diagnóstico recente de displasia de alto grau NIC 2, NIC 3 ou NIC 2/3.

As participantes de pesquisa do Grupo G2 foram incluídas no estudo no dia do tratamento excisional, o qual a paciente já teve realizado previamente os procedimentos de colposcopia, citologia, genotipagem para HPV e biópsia com diagnóstico de lesão precursora. Após os resultados da biópsia confirmatória das participantes de pesquisa do Grupo G2 vierem com resultado de HPV detectado e NIC 2, NIC 3 ou NIC 2/3 confirmado que as participantes do Grupo G1 foram devidamente pareadas. Após resultado de citologia normal e HPV não detectado que as participantes de pesquisa do Grupo G1 foram devidamente incluídas no estudo.

As etapas de avaliação molecular e microscópica da microbiota vaginal, foram realizadas na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX), no Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Crítérios de elegibilidade

Os critérios de inclusão foram mulheres em idade reprodutiva (menacme), com 18 anos ou mais e que não estavam na menopausa. Foram utilizados como critérios de exclusão as participantes que apresentavam histórico prévio de imunodeficiências

ou neoplasias, aquelas previamente vacinadas contra o HPV, gestantes ou lactantes no momento da inclusão, bem como mulheres incapacitadas ou em situação de vulnerabilidade. Qualquer resultado de carcinoma invasivo, NIC 1 ou HPV não detectado gerou a exclusão da participante do Grupo G2. Qualquer resultado de citologia alterada ou HPV detectado gerou a exclusão da participante do Grupo G1.

Coleta de Dados

Os dados do estudo foram coletados e gerenciados por meio da plataforma eletrônica REDCap que é um aplicativo seguro baseado na web, com acesso controlado, desenvolvido para auxiliar na coleta de dados para estudos de investigação. Os dados específicos coletados para o protocolo foram a data de nascimento e etnia; resultados do rastreamento do colo do útero; data e resultado da citologia; resultado do exame para detecção do HPV; resultados da colposcopia; resultados de patologia de todas as biópsias do colo do útero.

Coleta e processamento das amostras para análises microscópicas e moleculares da microbiota vaginal

Durante o exame especular, empregando-se o espéculo bivalve de Collins esterilizado e isento de qualquer lubrificante, foram coletadas amostras vaginais para a análise da microbiota. O exame ginecológico envolveu a realização dos procedimentos na seguinte sequência: inicialmente foi feita a inspeção dos genitais externos para detecção de lesões vulvares e perianais. Em seguida, procedeu-se ao afastamento das paredes vaginais com o uso de espéculo bivalve de Collins, isento de lubrificante, para inspeção tanto das paredes vaginais quanto do colo uterino. Posteriormente, as amostras foram coletadas utilizando *swab* estéril da marca Copan, imerso em meio líquido de Amies sem ágar, do conteúdo do terço médio da parede da vagina, destinado à avaliação molecular da microbiota vaginal. O pH vaginal foi aferido utilizando-se tiras comerciais (escala: 4,0–7,0, Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, efetuou-se a coleta de um *swab* estéril do conteúdo do terço médio da parede da vagina para confecção de lâminas destinadas à análise microscópica da microbiota. Por fim, foi realizada a coleta utilizando escovas do tipo *Rover's Cervex-Brush Combi* para exame citológico.

Coleta e processamento das amostras para genotipagem estendida de HPV

As amostras citológicas foram coletadas pelos ginecologistas do Hospital do Câncer de Barretos (Grupo G2) e pela enfermeira responsável pela coleta de material para exame de Papanicolaou do Hospital do Câncer de Barretos (Grupo G1) e armazenadas em meio líquido (*BD SurePath™*). Foram utilizadas para esse fim escovas tipo *Rover's Cervex-Brush Combi*. Toda a cabeça da escova foi inserida no frasco contendo o líquido e enviada ao laboratório de Patologia do Hospital do Câncer de Barretos. A genotipagem estendida de HPV foi realizada pela plataforma *BD Onclarity HPV Assay*, seguindo as recomendações do fabricante. Esta plataforma apresenta resultados individuais para 6 tipos de HPV de alto risco (16, 18, 45, 31, 51 e 52) e resultados agrupados para os 8 restantes (33+58, 35+39+68 e 56+59+66).

Diagnóstico microscópico do padrão da microbiota vaginal

A coloração dos esfregaços vaginais foi realizada pelo método de Gram. A avaliação microscópica foi conduzida de forma padronizada, de acordo com critérios morfológicos previamente validados. A classificação da vaginose bacteriana (VB) seguiu o sistema de pontuação descrito por Nugent et al. (1991), baseado na análise semiquantitativa de três morfotipos bacterianos observados nos esfregaços corados pelo método de Gram, que são: bacilos gram-positivos longos, representativos de *Lactobacillus* spp.; bacilos curtos, cocobacilos gram-variáveis e gram-negativos, representativos de *Gardnerella vaginalis* e *Bacteroides* spp; e bacilos gram-variáveis curvos, compatíveis com *Mobiluncus* spp. Cada morfotipo foi classificado em uma escala de 0 a 4+, e a soma dos escores resultou na pontuação total, variando de 0 a 10. Os resultados foram interpretados como Flora I (microbiota normal; 0–3), Flora II (microbiota intermediária; 4–6) ou Vaginose Bacteriana (disbiose; 7–10) (28).

A identificação de Vaginose Citolítica foi realizada conforme os critérios propostos por Cibley e Cibley (1991), considerando-se os parâmetros de ausência de *Candida* spp. ou *Trichomonas vaginalis*; predomínio acentuado de lactobacilos; escassez ou ausência de leucócitos; e evidência de citólise epitelial, caracterizada pela presença de núcleos celulares desnudos (29). Já para a avaliação da Vaginite Aeróbia (VA) seguiu os critérios descritos por Dong et al. (2022), com base em quatro parâmetros: grau lactobacilar; presença e morfologia de bactérias aeróbias; relação entre leucócitos e células epiteliais; e presença de células epiteliais parabasais ou basais. Cada parâmetro recebeu uma pontuação específica, sendo o escore final

utilizado para classificar a VA como ausente (0–2), leve (3–4), moderada (5–6) ou grave (7–10) (30).

Os esfregaços também foram avaliados segundo a classificação morfológica proposta por Ison e Hay (2002), que para os fins deste estudo, mulheres com diagnóstico de atrofia vaginal foram excluídas, sendo mantidos exclusivamente os esfregaços classificados como Grau 0, caracterizados pela presença de células epiteliais sem bactérias visíveis, indicativos de flora escassa (31).

Análise molecular da microbiota vaginal

As amostras obtidas de terço médio da parede da vagina com *swab* estéril da marca Copan, imerso em meio líquido de Amies sem ágar, foram descongeladas e submetidas à extração do DNA bacteriano total utilizando *ZymoBIOMICS DNA Kits*, conforme instruções do fabricante e congeladas a -80°C após eluição em 100 uL de água ultrapura.

Todas as amostras foram submetidas à quantificação do DNA total utilizando *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit*. Em seguida, foi realizada etapa de *End-Point* PCR para amplificação da sequência de 532bp da região V3-V4 do gene bacteriano que codifica o RNA ribossômico 16S e, posteriormente, os produtos amplificados seguiram o *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* para o sequenciamento na plataforma *Illumina MiSeq System* (Illumina Inc.).

Análise bioinformática do sequenciamento 16s rRNA

Os arquivos *.fastq* relativos às leituras *forward* e *reverse* foram importados para o software R e o microbioma foi analisado pelo pacote “*dada2*”. Os dados foram filtrados de acordo com a qualidade e de-replicados. Em seguida, um modelo parametrizado de substituição de erros das leituras foi aplicado e os erros foram filtrados, restando apenas as sequências inferidas da comunidade. Depois apenas as sequências comuns às leituras *forward* foram selecionadas para as análises. Por fim, foram removidas as bimeras e as sequências restantes foram classificadas de acordo com a base *Ribosomal Database Project* (RDP Classifier version 2.14) (32).

As análises subsequentes foram realizadas com os pacotes “*Biostrings*” e “*Phyloseq*”, após inserção dos metadados, com os dados clinicopatológicos das pacientes. As sequências que não foram classificadas pelo menos até Gênero foram descartadas. Em seguida, foi calculada a abundância relativa de cada amostra em

nível de Gênero e Espécie, e a prevalência em nível de Espécie. Aquelas espécies com prevalência menor do que 5% também foram removidas das análises, por serem consideradas como possíveis erros de leitura. A clusterização em CSTs foi realizada empregando o método VALENCIA (33), baseado nas espécies bacterianas identificadas, bem como suas abundancias relativas. Os gráficos foram construídos com os pacotes “ggplot2” e “ComplexHeatmap”. A abundância das espécies por amostra foi computada, e foi calculada a alfa-diversidade de Shannon. Por fim, foram construídos *heatmaps* em nível de espécie com as co-variáveis de interesse.

Análises estatísticas

Realizamos uma caracterização da população amostral quanto aos dados clinicopatológicos para a caracterização da microbiota vaginal das mulheres diagnosticadas com NIC2, NIC3 ou NIC2/3. Foram comparados os dados clinicopatológicos gerados das análises entre os grupos experimentais G1 e G2. Para a análise qualitativa das variáveis categóricas do estudo, foram aplicados o teste do qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

2.5 RESULTADOS

Este projeto foi desenvolvendo a partir de um projeto guarda-chuva, realizado em parceria entre a Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e o Hospital do Câncer de Barretos. Durante o período compreendido neste projeto, foram incluídas 59 participantes de pesquisa do Hospital do Câncer de Barretos. Dessas, 37 são pacientes que foram submetidas a exérese da lesão intraepitelial cervical de alto grau HPV detectado (G2) e 22 eram pacientes controle, sem lesão, HPV não detectado (G1) e pareadas quanto a idade (± 5 anos) e tabagismo. Os resultados preliminares caracterizam a população incluída até o momento, quanto a dados sociodemográficos, ginecológicos, além das análises microscópicas da microbiota após coloração de Gram. Ademais, a caracterização da microbiota vaginal pelo sequenciamento das 59 pacientes está descrita, juntamente com a análise estatística realizada. Em geral, não foram encontradas diferenças estatísticas nos dados sociodemográficos entre os 2 grupos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Dados sociodemográficos das participantes do estudo.

		Grupo G1 Número de participantes (%)	Grupo G2 Número de participantes (%)	P valor*
Idade	Mediana	36	33	0,071
Etnia	Pretas	(3) 13,6%	(4) 10,8 %	0,535
	Pardas	(8) 36,4 %	(19) 51,4 %	
	Branças	(11) 50,0 %	(14) 37,8 %	
Escolaridade**	EF Incompleto	(0) 0,0 %	(4) 10,8 %	0,1477
	EF Completo	(0) 0,0 %	(5) 13,5 %	
	EM Incompleto	(2) 9,1 %	(3) 8,1 %	
	EM Completo	(9) 40,9 %	(16) 43,2 %	
	ES Incompleto	(3) 13,6 %	(3) 8,1 %	
	ES Completo	(8) 36,4%	(6) 16,1%	
Uso de álcool	Sim	(11) 50,0 %	(17) 45,9 %	0,730
	Não	(11) 50,0 %	(20) 54,1 %	
Uso de tabaco	Sim	(4) 18,2 %	(10) 27,0 %	0,440
	Não	(18) 81,8 %	(27) 73,0 %	

* Utilizados testes exatos de Fisher ou chi-quadrado e Mann-Whitney (idade).

** EF: ensino fundamental; EM: ensino médio; ES: ensino superior.

A **Tabela 2** evidencia os dados ginecológicos das participantes da pesquisa. Considerando o uso de contraceptivos, mais de 50% das pacientes sem lesão relataram não utilizar nenhum método contraceptivo. Aproximadamente 40% das pacientes do grupo com lesão, por sua vez, relataram o uso de contraceptivo hormonal (P=0,023).

Tabela 2. Dados ginecológicos das participantes do estudo.

		Grupo G1	Grupo G2	P valor*
Relação sexual nos últimos 60 dias	Sim	(20) 90,9 %	(31) 83,8 %	0,697
	Não	(2) 9,1 %	(6) 16,2 %	
Uso de preservativo nos últimos 60 dias	Sim	(3) 13,6 %	(2) 5,4 %	0,369
	Não	(19) 86,4 %	(35) 94,6 %	
Ducha vaginal nos últimos 60 dias	Sim	(4) 18,2 %	(6) 16,2 %	1,000
	Não	(18) 81,8 %	(31) 83,8 %	
Sintomatologia	Presente	(10) 45,5 %	(21) 56,8 %	0,401
	Ausente	(12) 54,5 %	(16) 43,2 %	
Uso de contraceptivos	Diu (cobre)	(3) 13,6 %	(0) 0,0 %	0,023
	Hormonais	(7) 31,2%	(24) 64,8%	
	Laqueadura	(1) 4,5 %	(2) 5,5 %	
	Nenhum	(11) 50,7 %	(11) 29,7 %	

* Utilizados testes exatos de Fisher ou chi-quadrado.

Considerando que a positividade para HPV foi um critério de exclusão no G1, apenas as pacientes de G2 do presente projeto apresentaram HPV detectado. A **Tabela 3** representa o resultado das biópsias após a exérese e a quantidade de pacientes de acordo com o genótipo para HPV.

Tabela 3. Resultados de biópsia confirmatória e genótipo do HPV para o grupo G2.

		Número (%)
Biópsia	NIC2	5 (13,5)
	NIC3	32 (86,5)
Genótipo do HPV	HPV 16	17 (45,9)
	HPV 18	1 (2,7)

HPV 31	5 (13,5)
HPV 51	1 (2,7)
HPV 52	6 (16,2)
HPV 33+58	7 (18,9)
HPV 35+39+68	4 (10,8)
HPV 56+59+66	3 (8,11)

A **Tabela 4** evidencia a análise microscópica após coloração por Gram, onde os resultados também foram agrupados baseados na dominância do *Lactobacillus spp.* na microbiota vaginal e o resultado do pH vaginal no momento da coleta.

Tabela 4. Resultados do Gram associados à dominância de *Lactobacillus spp.* e ao pH vaginal

		Grupo G1	Grupo G2	P valor*
Gram**	Flora I	(7) 31,8%	(14) 37,8%	0,373
	Flora II	(3) 13,6%	(3) 8,1%	
	VC	(4) 18,2%	(2) 5,4%	
	VB	(8) 36,4%	(18) 48,6%	
Dominância por <i>Lactobacillus</i>	Dominada	(11) 50,0%	(16) 43,2%	0,599
	Intermediária	(3) 13,6%	(3) 8,2%	
	Depletada	(8) 36,4%	(18) 48,6%	
pH	> 4,5	(8) 36,4%	(19) 51,4%	0,264
	≤ 4,5	(14) 63,6%	(18) 48,6%	

* Utilizados testes exatos de Fisher ou chi-quadrado; **VC=Vaginose citolítica, VB=Vaginose bacteriana.

No total, após atribuição taxonômica durante a análise do sequenciamento, foram encontradas 815 sequências diferentes, correspondendo a 200 táxons distintos. Destes, 174 táxons foram classificados pelo menos até o nível de Gênero. A abundância relativa de cada amostra em nível de Gênero e Espécie foi calculada. Em seguida, as pacientes foram classificadas em *Community State Types* (CSTs) de

acordo com Ravel et al. (2011) (20). A **Tabela 5** reporta as CSTs encontradas nas 59 pacientes sequenciadas.

Tabela 5. Community State Types (CSTs) das 59 pacientes sequenciadas.

	CST I	CST II	CST III	CST IV	CST V	P valor*
Grupo G1	6 (27,3%)	1 (4,5%)	7 (31,8%)	8 (36,4%)	0 (0,0)	0,950
Grupo G2	10 (27,0%)	2 (5,4%)	14 (37,8%)	11 (29,7%)	0 (0,0)	

* Utilizados testes exatos de Fisher ou chi-quadrado.

A **Figura 1** representa táxons considerados mais relevantes, com prevalência mínima de 5% e abundância relativa mínima de 5% em pelo menos 1 paciente.

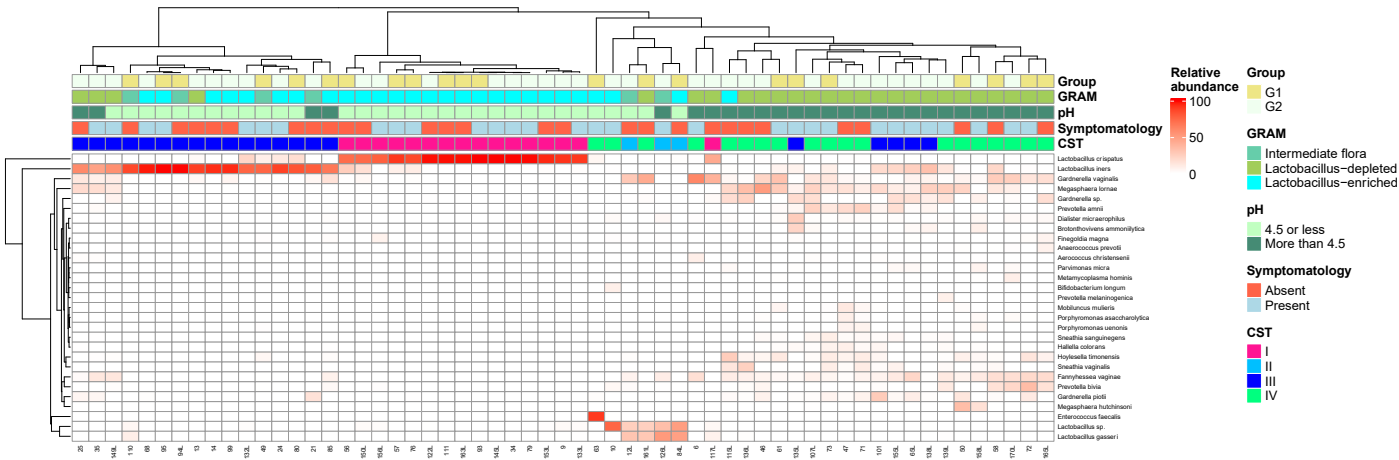


Figura 1: Abundância relativa dos táxons, considerados mais relevantes, nas 59 pacientes sequenciadas até o momento, e associação com dados clínico-patológicos.

Também foi calculada, a alfa diversidade de Shannon, que foi semelhante entre os 2 grupos de mulheres (**Figura 2**).

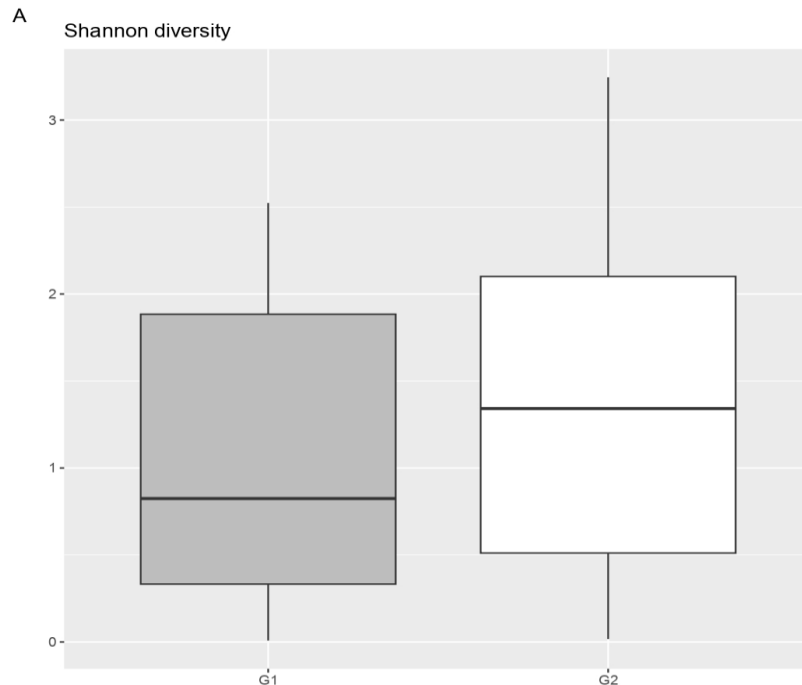


Figura 2 – Alfa diversidade de Shannon das pacientes sequenciadas no trabalho.

2.6 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado que a microbiota vaginal desempenha papel significativo na oncogênese viral do CCU. Uma microbiota com redução de *Lactobacillus spp.* está associada ao aumento da taxa de infecção por HPV, maior persistência viral, diminuição do *clearance* e ao desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) (6,10-16,34-36). À luz destes fatos, o presente projeto buscou caracterizar a microbiota vaginal das pacientes com lesões NIC 2 ou 3 e comparar com pacientes sem lesão, HPV não detectado, para analisar uma possível associação entre a disbiose e a presença de lesões pré-neoplásicas.

A maioria das participantes da nossa coorte era sexualmente ativa e relatou não utilizar preservativos de forma regular, dados que são alarmantes em relação ao aumento da susceptibilidade à infecção pelo HPV. A evidência científica sobre a relação entre o uso de contraceptivos hormonais e o risco de infecção pelo HPV ou progressão para lesões cervicais ainda é inconclusiva (37-39). Alguns estudos relatam

associação entre o uso prolongado desses métodos e maior prevalência ou persistência de diversas endocervicites. No entanto, Akter e colaboradores (2022) (40) realizaram uma revisão sistemática de 37 estudos e não encontraram uma associação consistente entre a relação diferenciando para cada tipo de infecção das endocervicites e o uso de contraceptivos hormonais. Em contrapartida, o uso de métodos contraceptivos de barreira, especialmente o preservativo, mostrou-se capaz de reduzir parcialmente o risco de aquisição e a duração da infecção em estudos de coorte. Embora os resultados de meta-análises sejam heterogêneos, observa-se que o uso consistente de preservativos está mais claramente associado à redução de lesões e verrugas do que à simples detecção do DNA viral, além de favorecer a regressão das infecções já estabelecidas (37,41).

Em relação à contracepção hormonal, encontramos uma diferença estatística nos métodos entre os 2 grupos experimentais ($p = 0,023$). Aproximadamente 64,8% das pacientes com lesão utilizavam contraceptivos hormonais, contra 31,2% das pacientes das mulheres sem lesão. A relação entre o uso de contraceptivos hormonais e o risco de infecção pelo HPV ou progressão para lesões cervicais apresenta resultados heterogêneos na literatura (42-45). Alguns estudos indicam que o uso prolongado, especialmente por vários anos, pode estar associado a maior risco de lesões intraepiteliais e câncer cervical. No entanto, revisões mais recentes como a de Anastasiou e colaboradores (2022) (46) sugerem que, devido a fatores comportamentais, essa associação torna-se inconsistente, indicando que o efeito direto dos contraceptivos hormonais sobre a carcinogênese pode ser limitado.

Ademais, a elevada frequência de VB observada evidencia um estado de disbiose predominante na população estudada. A presença constante de anaeróbios em mulheres com diagnóstico de NIC tem sido consistentemente descrita na literatura, reforçando que, embora a infecção persistente por HPV de alto risco seja necessária para o desenvolvimento do CCU, não é suficiente isoladamente, sendo a microbiota vaginal um possível modulador essencial da resposta imune local (47). Um estudo por Guo e colaboradores (2012) investigou os efeitos da VB sobre os desfechos da infecção pelo HPV. Das 707 mulheres que apresentaram HPV detectado, 298 (42,1%) apresentaram *clearance* viral, enquanto as 409 restantes mantiveram infecção persistente. Os grupos com infecção persistente e com *clearance* apresentaram taxas semelhantes de VB no início do estudo. Porém ao final, a prevalência de VB foi de 11,2% no grupo com infecção persistente, em contraste com 5,0% no grupo que

apresentou *clearance*, diferença estatisticamente significativa. Observou-se uma menor taxa de eliminação do HPV em mulheres com VB ativa, em comparação àquelas sem VB. Além disso, a história natural da infecção pelo HPV não foi influenciada pela carga viral nem pela presença de VB no início do estudo (48). Em conjunto com os achados, os dados supracitados sugerem que a vaginose bacteriana, mesmo que não esteja associada com a infecção do HPV por si, pode favorecer a persistência desta infecção. No entanto, para confirmação destes dados postulados, são necessários estudos mais aprofundados com a vigilância ativa do estado da eubiose das mulheres infectadas por HPV, bem como o tratamento das disbioses, mesmo naquelas assintomáticas.

Liu e colaboradores (2019), relataram maior *clearance* viral em microbiotas dominadas por *L. crispatus* (CST I) em comparação a CST III, dominada por *L. iners*, frequentemente associada à transição para estados disbióticos. A classificação da microbiota vaginal em CSTs permite compreender relações como o CST I e o CST II, têm sido associados a efeito protetor contra a infecção e a maior *clearance* do HPV em lesões de baixo grau. Em contrapartida, o CST IV está fortemente associado à persistência viral, à infecção por HPV de alto risco e ao desenvolvimento de lesões de alto grau e câncer invasivo (49). Musa et al. (2023) reforçam essa associação, demonstrando que mulheres com microbiota classificada como CST III ou CST IV apresentaram maior risco de HSIL e câncer invasivo, especialmente na presença de coinfeção por HIV, fator que potencializa a progressão da doença (22). Estudos como os de Al Kassa et al. (2014) e Fraszczak et al. (2022) sugerem que a capacidade protetora dos *Lactobacillus spp.* pode estar relacionada à conformação do carbono quiral no ácido láctico produzido por essas espécies. *L. crispatus* (CST I) produz tanto L- quanto D-ácido láctico, sendo o isômero D- mais eficaz na inibição viral, enquanto *L. iners* (CST III) produz exclusivamente o isômero L-, associado a menor proteção e maior suscetibilidade à persistência do HPV (18,19).

Achados de Audirac et al. (2016) mostraram que a composição microbiana varia conforme a progressão das lesões cervicais, com transição de comunidades CST I, típicas de mulheres HPV não detectadas, para CST IV em casos de NIC 2/3 e predominância de *Sneathia spp.* e *Fusobacterium spp.*, incluindo *F. necrophorum* em amostras de câncer cervical (17). Esses resultados corroboram os achados de Łaniewski et al. (2018), que relataram associação entre infecção persistente por HPV, presença de lesões cervicais e perfis de disbiose caracterizados por maior abundância

de *Gardnerella vaginalis*, *Fannyhessea vaginae*, *Sneathia spp.* e outras bactérias anaeróbias, além de aumento da diversidade microbiana (50). Este estudo não encontrou significância estatística na diferenciação entre os perfis CSTs ($p = 0,950$), porém mostrou em nossa coorte que em ambos os grupos as participantes de pesquisa se encontravam na maioria no perfil CST IV ou CST III que são associados a uma disbiose bacteriana e uma maior susceptibilidade a disbiose respectivamente (51-53). No entanto, o perfil CST feito nessa coorte categorizou as amostras em 5 grupos diferentes, sendo que 4 deles são ricos em *Lactobacillus*. Estudos mais aprofundados são necessários a partir deste, em que táxons bacterianos específicos (além da presença/ausência de *Lactobacillus*) devem ser comparados entre os diferentes grupos de pacientes.

Entre limitações do presente estudo, destaca-se a diminuição no número final de participantes incluídas como previsto no início do projeto, decorrente do tempo disponível para a execução do projeto e das dificuldades inerentes ao recrutamento de participantes que atendessem integralmente aos critérios de elegibilidade estabelecidos. Além disso, por se tratar de exames inseridos na rotina assistencial do hospital para liberação das participantes para o sequenciamento, foi necessário aguardar a liberação de resultados laboratoriais específicos para a adequada alocação das participantes nos respectivos grupos, o que impactou diretamente a inclusão amostral ao longo do período de coleta. Ainda assim, os dados obtidos permitem análises relevantes e contribuem para a compreensão da relação entre microbiota vaginal e o desenvolvimento das lesões cervicais de alto grau, reforçando a necessidade de estudos futuros com maior tempo de acompanhamento e ampliação da amostra.

2.7 CONCLUSÃO

Embora o presente projeto não tenha identificado diferenças estatisticamente significativas, os achados da literatura sugerem que a diversidade bacteriana pode estar associada à complicação da infecção pelo HPV. Os resultados parciais reforçam a importância de investigações adicionais, principalmente em nível de gênero e/ou espécie, que poderão esclarecer com maior precisão a relação entre microbiota vaginal e o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas cervicais.

2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Cancer Today [Internet]. 2025 [cited 2025 Sep 16]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&sexes=2&age_end=12&group_population=1&types=0_1&sort_by=value1
2. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. [Internet]. 2023 [cited 2025 Sep 28]. Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>
3. Brasil. Ministério da Saúde. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hpv>. 2021 [cited 2025 Oct 2]. HPV. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hpv>
4. Arroyo Mühr LS, Eklund C, Lagheden C, Correa RM, Fellner MD, Picconi MA, et al. The Human Papillomavirus (HPV) Laboratory e-Manual: A comprehensive guide for HPV testing and research. *Journal of Clinical Virology*. 2025 Aug 1;179.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Rastreamento do Câncer do Colo do Útero (Diretriz Brasileira) [Internet]. 2025 [cited 2025 Sep 16]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/pcdt/r/rastreamento-cancer-do-colo-do-utero/view>
6. Gardella B, Pasquali MF, La Verde M, Cianci S, Torella M, Dominoni M. The Complex Interplay between Vaginal Microbiota, HPV Infection, and Immunological Microenvironment in Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Literature Review. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 28;23(13):7174.
7. Yu L, Majerciak V, Zheng ZM. HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
8. Demarco M, Hyun N, Carter-Pokras O, Raine-Bennett TR, Cheung L, Chen X, et al. A study of type-specific HPV natural history and implications for contemporary cervical cancer screening programs. *EClinicalMedicine*. 2020 May 1;22.
9. Brouwer AF, Campredon LP, Walline HM, Marinelli BM, Goudsmit CM, Thomas TB, et al. Incidence and clearance of oral and cervicogenital HPV infection: longitudinal analysis of the MHOC cohort study. *BMJ Open*. 2022 Jan 3;12(1):e056502.
10. Brusselaers N, Shrestha S, van de Wijgert J, Verstraelen H. Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis. Vol. 221, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby Inc.; 2019. p. 9-18.e8.
11. Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki AB. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Translational Research*. 2017 Jan;179:168–82.
12. Molina MA, Coenen BA, Leenders WPJ, Andralojc KM, Huynen MA, Melchers WJG. Assessing the Cervicovaginal Microbiota in the Context of hrHPV Infections: Temporal Dynamics and Therapeutic Strategies. Vol. 13, *mBio*. American Society for Microbiology; 2022.
13. Molina MA, Andralojc KM, Huynen MA, Leenders WPJ, Melchers WJG. In-depth insights into cervicovaginal microbial communities and hrHPV infections using high-resolution microbiome profiling. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2022 Sep 28;8(1):75.
14. Norenhag J, Du J, Olovsson M, Verstraelen H, Engstrand L, Brusselaers N. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis. *BJOG*. 2020 Jan 17;127(2):171–80.
15. Wei B, Chen Y, Lu T, Cao W, Tang Z, Yang H. Correlation between vaginal microbiota and different progression stages of cervical cancer. *Genet Mol Biol*. 2022;45(2).

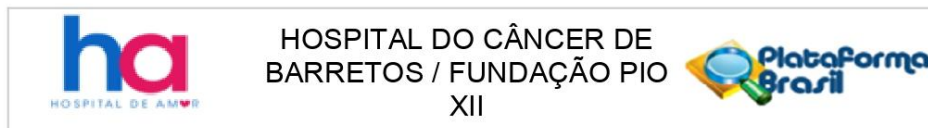
16. Wu S, Ding X, Kong Y, Acharya S, Wu H, Huang C, et al. The feature of cervical microbiota associated with the progression of cervical cancer among reproductive females. *Gynecol Oncol*. 2021 Nov;163(2):348–57.
17. Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Téllez-Sosa J, Martínez-Barnetche J, Cortina-Ceballos B, et al. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS One*. 2016 Apr 26;11(4):e0153274.
18. Al Kassaa I, Hober D, Hamze M, Chihib NE, Drider D. Antiviral Potential of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2014 Dec 1;6(3–4):177–85.
19. Frąszczak K, Barczyński B, Kondracka A. Does *Lactobacillus* Exert a Protective Effect on the Development of Cervical and Endometrial Cancer in Women? *Cancers (Basel)*. 2022 Oct 7;14(19):4909.
20. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011 Mar 15;108(supplement_1):4680–7.
21. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep*. 2015 Nov 17;5(1):16865.
22. Musa J, Maiga M, Green SJ, Magaji FA, Maryam AJ, Okolo M, et al. Vaginal microbiome community state types and high-risk human papillomaviruses in cervical precancer and cancer in North-central Nigeria. *BMC Cancer*. 2023 Jul 20;23(1):683.
23. Piyathilake CJ, Ollberding NJ, Kumar R, Macaluso M, Alvarez RD, Morrow CD. Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses. *Cancer Prevention Research*. 2016 May 1;9(5):357–66.
24. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Tracy JK, Zenilman JM, Ravel J, et al. Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection. *Journal of Infectious Diseases*. 2014 Dec 1;210(11):1723–33.
25. Brotman RM, He X, Gajer P, Fadrosh D, Sharma E, Mongodin EF, et al. Association between cigarette smoking and the vaginal microbiota: a pilot study. *BMC Infect Dis*. 2014 Dec 28;14(1):471.
26. Marconi C, et al. Characterization of the vaginal microbiome in women of reproductive age from 5 regions in Brazil. *Sex Transm Dis*. 2020;47(8):562–569.
27. Novak J, et al. Characteristics associated with *Lactobacillus iners*-dominated vaginal microbiota. *Sex Transm Infect*. 2022;98(5):353–359.
28. Nugent, RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation [Internet]. Vol. 29, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1991. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
29. Cibley LJ, Cibley LJ. Cytolytic vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165(4):1245–9.
30. Dong M, et al. Aerobic vaginitis diagnosis criteria combining Gram stain with clinical features: an establishment and prospective validation study. *Diagnostics*. 2022;12(1):185.
31. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram-stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect*. 2002;78(6):413–415.

32. Wang Q, Cole JR. Updated RDP taxonomy and RDP Classifier for more accurate taxonomic classification. *Microbiol Resour Announc*. 2024 Apr 11;13(4).
33. France MT, Ma B, Gajer P, Brown S, Humphrys MS, Holm JB, et al. VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. *Microbiome*. 2020 Dec 1;8(1).
34. Łaniewski P, İlhan ZE, Herbst-Kralovetz MM. The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy. *Nature Reviews Urology*. Nature Research; 2020.
35. Mancilla V, Jimenez NR, Bishop NS, Flores M, Herbst-Kralovetz MM. The Vaginal Microbiota, Human Papillomavirus Infection, and Cervical Carcinogenesis: A Systematic Review in the Latina Population. *J Epidemiol Glob Health*. 2024 Jun 1;14(2):480–97.
36. Teka B, Yoshida-Court K, Firdawoke E, Chanyalew Z, Gizaw M, Addissie A, et al. Cervicovaginal Microbiota Profiles in Precancerous Lesions and Cervical Cancer among Ethiopian Women. *Microorganisms*. 2023 Mar 24;11(4):833.
37. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, et al. Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women [Internet]. Vol. 354, n engl j med. 2006. Available from: www.nejm.org
38. Marks M, Gravitt PE, Gupta SB, Liaw KL, Tadesse A, Kim E, et al. Combined oral contraceptive use increases HPV persistence but not new HPV detection in a cohort of women from Thailand. In: *Journal of Infectious Diseases*. 2011. p. 1505–13.
39. Green J, De Gonzalez AB, Smith JS, Franceschi S, Appleby P, Plummer M, et al. Human papillomavirus infection and use of oral contraceptives. *Br J Cancer*. 2003 Jun 2;88(11):1713–20.
40. Akter T, Festin M, Dawson A. Hormonal contraceptive use and the risk of sexually transmitted infections: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1).
41. Manhart LE, Koutsky LA. Do Condoms Prevent Genital HPV Infection, External Genital Warts, or Cervical Neoplasia? *Sex Transm Dis*. 2002 Nov;
42. Steiner RJ, Pampati S, Kortsmid KM, Liddon N, Swartzendruber A, Pazol K. Long-Acting Reversible Contraception, Condom Use, and Sexually Transmitted Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. Vol. 61, *American Journal of Preventive Medicine*. Elsevier Inc.; 2021. p. 750–60.
43. Harris TG, Miller L, Kulasingam SL, Feng Q, Kiviat NB, Schwartz SM, et al. Depot-medroxyprogesterone acetate and combined oral contraceptive use and cervical neoplasia among women with oncogenic human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(5):489.e1–489.e8.
44. Balle C, Happel AU, Heffron R, Jaspan HB. Contraceptive effects on the cervicovaginal microbiome: Recent evidence including randomized trials. Vol. 90, *American Journal of Reproductive Immunology*. John Wiley and Sons Inc; 2023.
45. Bovo AC, Pedrão PG, Guimarães YM, Godoy LR, Resende JCP, Longatto-Filho A, et al. Combined Oral Contraceptive Use and the Risk of Cervical Cancer: Literature Review. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*. 2023 Mar 17;45(12):E818–24.
46. Anastasiou E, McCarthy KJ, Gollub EL, Ralph L, van de Wijgert JHHM, Jones HE. The relationship between hormonal contraception and cervical dysplasia/cancer controlling for human papillomavirus infection: A systematic review. *Contraception*. 2022 Mar 1;107:1–9.
47. 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;2011:1–8.

48. Guo Y I, You K, Qiao J, Zhao Y m, Geng L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *Int J STD AIDS*. 2012 Aug 1;23(8):581–4.
49. Liu J, Luo M, Zhang Y, Cao G, Wang S. Association of high-risk human papillomavirus infection duration and cervical lesions with vaginal microbiota composition. *Ann Transl Med*. 2020 Sep;8(18):1161–1161.
50. Łaniewski P, Barnes D, Goulder A, Cui H, Roe DJ, Chase DM, et al. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women. *Sci Rep*. 2018 May 15;8(1):7593.
51. 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*. 2017 Aug 31;7(1):10200.
52. Chen Y, Qiu X, Wang W, Li D, Wu A, Hong Z, et al. Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia progression are associated with increased vaginal microbiome diversity in a Chinese cohort. *BMC Infect Dis*. 2020 Dec 26;20(1):629.
53. Shi W, Zhu H, Yuan L, Chen X, Huang X, Wang K, et al. Vaginal microbiota and HPV clearance: A longitudinal study. *Front Oncol*. 2022 Oct 24;12.

3 ANEXOS

3.1 ANEXO A – PARECER DO CEP HOSPITAL CÂNCER DE BARRETOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Microbiota vaginal de mulheres com diagnóstico de lesão intraepitelial cervical de alto grau pré e pós tratamento excisional

Pesquisador: Lucas Tadeu Bidinotto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71161023.5.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.205.755

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento Informações Básicas da Pesquisa n.º 2161553 datado em 03/07/2023.

INTRODUÇÃO

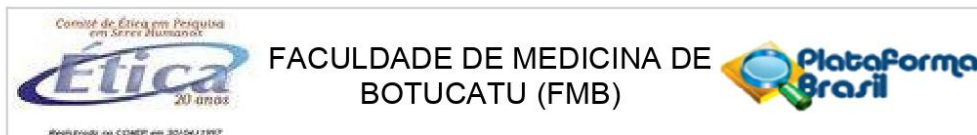
O câncer cervical tem como principal causa a infecção persistente por HPV de alto risco. No entanto, os mecanismos associados ao clearance ou persistência da infecção por HPV continuam pouco entendidos e parecem ser multifatoriais, sendo que eventuais fatores protetores da microbiota lactobacilar estejam associados.

HIPÓTESE

Considerando esta temática de extrema relevância e com os desenhos de estudos anteriores muitas vezes com amostras não homogêneas e de número amostral baixo, existem lacunas na literatura para a realização de estudos que possam, de fato, contribuir para o entendimento do papel das disbioses no clearance do HPV. Adicionalmente, nossa pesquisa na literatura não

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331, Dr. Paulo Prata, Instituto de Ensino e Pesquisa, sala CEP s/n
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br

3.2 ANEXO B – PARECER DO CEP FMB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Microbiota vaginal de mulheres com diagnóstico de lesão intraepitelial cervical de alto grau pré e pós tratamento excisional

Pesquisador: Lucas Tadeu Bidinotto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71161023.5.3001.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.554.852

Apresentação do Projeto:

As informações descritas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas dos documentos e arquivo - Informações Básicas da Pesquisa com data de 24/10/2023.

Introdução:

O câncer cervical tem como principal causa a infecção persistente por HPV de alto risco. No entanto, os mecanismos associados ao clearance ou persistência da infecção por HPV continuam pouco entendidos e parecem ser multifatoriais, sendo que eventuais fatores protetores da microbiota lactobacilar estejam associados.

Hipótese:

Considerando esta temática de extrema relevância e com os desenhos de estudos anteriores muitas vezes com amostras não homogêneas e de número amostral baixo, existem lacunas na literatura para a realização de estudos que possam, de fato, contribuir para o entendimento do papel das disbioses no clearance do HPV. Adicionalmente, nossa pesquisa na literatura não encontrou a caracterização da microbiota de pacientes brasileiras diagnosticadas com NIC 2 e NIC 3 e nem na possível evolução, remissão ou manutenção destas

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