



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Gislaine Curty Ferreira

Análise do microbioma cervicovaginal de mulheres HIV positivas com lesões intra-epiteliais cervicais no período pós-parto

Orientador : Prof. Dr. Marcelo A. Soares

**RIO DE JANEIRO
2018**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Gislaine Curty Ferreira

Análise do microbioma cervicovaginal de mulheres HIV positivas com lesões intra-epiteliais cervicais no período pós-parto

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia

Orientador: Dr. Marcelo A. Soares

**RIO DE JANEIRO
2018**

F383a Ferreira, Gislaine Curty.

Análise do microbioma cervicovaginal de mulheres HIV positivas com lesões intra-epiteliais cervicais no período pós- parto/ Gislaine Curty Ferreira. – Rio de Janeiro, 2018.

xvi, 62f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018.

Orientador: Marcelo A. Soares.

1. Microbiota. 2. Análise de Sequência DNA. 3. HIV. 4. Papilomaviridae. 5. Neoplasia Intraepitelial Cervical. I. Soares, Marcelo A. (Orient.). II. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. III. Título.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Gislaine Curty Ferreira

Análise do microbioma cervicovaginal de mulheres HIV positivas com lesões intra-epiteliais cervicais no período pós-parto

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo A. Soares

Aprovada em: 28/02/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira - Presidente

Prof. Dr. Patrícia Savio de Araujo Souza

Prof. Dr. Caio Tavora Rachid Coelho Da Costa

Prof. Dr. Mariana Lima Boroni Martins – Suplente I

Prof. Dr. Renato Santana de Aguiar – Suplente II

**RIO DE JANEIRO
2018**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Análise do microbioma cervicovaginal de mulheres HIV positivas com lesões intra-epiteliais cervicais no período pós-parto

RESUMO- DISSERTAÇÃO DE MESTRADO – Gislaine Curty Ferreira

A microbiota cervical é um importante fator para manutenção da homeostase local e vários estudos têm associado complicações durante a gravidez e durante o período pós-parto com alterações na comunidade de bactérias cervicovaginais. Contudo, apesar da importância da microbiota cervical para o controle de infecções virais e manutenção da homeostase cervical, a sua diversidade e sua composição em mulheres HIV-positivas no período pós-parto ainda é desconhecida. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar e analisar o perfil da microbiota cervicovaginal de mulheres HIV-positivas no período pós-parto com neoplasia intraepitelial cervical, bem como analisar a associação das comunidades de bactérias presentes para as famílias de vírus de DNA circular. Para tanto, o DNA total foi extraído de amostras de esfregaço cervical de 80 mulheres HIV + e o gene bacteriano do RNA ribossomal 16S (região V3-V6) foi amplificado por PCR e sequenciado na plataforma Illumina HiSeq 2500. Após o sequenciamento, as *reads* foram processadas e comparadas com o banco de dados Greengenes usando o *open source* QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). Para a análise dos vírus de DNA circular, o DNA circular foi enriquecido pela amplificação do círculo rolante e sequenciado no HiSeq 2500. As *reads* foram processadas e os contigs foram gerados por montagem *de novo* e atribuídos às famílias virais utilizando BLASTX contra o banco de dados de vírus. Identificamos na análise do 16S dois tipos de comunidades de bactérias, denominadas de CSTs (do inglês, *Community State Types*) III e IV de acordo com o tipo de bactéria dominante. A CST III (*L.iners*-dominante) e a CST IV (alta diversidade) foram encontradas em 41% e 59% das amostras, respectivamente. Não encontramos associação das CST com o período pós-parto (6 ou 12 meses), HPV (positivo ou negativo) ou citologia (normal ou lesão). Entretanto, cinco gêneros de bactérias foram associados a lesões cervicais (*Gardnerella*, *Aerococcus*, *Schlegelella*, *Moryella* e *Bifidobacterium*), com uma razão de chance (OR, do inglês *odds ratio*) significativa de 40 (2,28-706) para a presença de *Moryella* e 3,5 (1,36-8,9) para *Schlegelella*. Foram identificadas quatro famílias virais: Anelloviridae, Genomoviridae, Herpesviridae e Papillomaviridae. A família Papillomaviridae apresentou alta frequência de CST IV para os tipos de HPV não-16 (33%) quando comparada às CST III (14%). Adicionalmente, as famílias virais Herpesviridae, Genomoviridae e Anelloviridae apresentaram uma associação significativa para a CST IV. Deste modo, este estudo demonstra que as mulheres HIV-positivas no pós-parto apresentam uma microbiota estável e de alta diversidade, sendo também associada a infecções por diferentes famílias virais. Por fim, este é o primeiro estudo a descrever o bacterioma cervical de mulheres HIV-positivas no pós-parto.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Analysis of the cervicovaginal microbiome from HIV-positive women with cervical intraepithelial lesions in the postpartum period

ABSTRACT- DISSERTAÇÃO DE MESTRADO – Gislaine Curty Ferreira

The cervical microbiota is an important factor for maintaining local homeostasis and several studies have associated complications during pregnancy and during the postpartum period with changes in the community of cervicovaginal bacteria. However, despite the importance of cervical microbiota for the control of viral infections and maintenance of cervical homeostasis, their diversity and composition in HIV-positive women in the postpartum period is still unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate and analyze the profile of the cervicovaginal microbiota of HIV-positive women at postpartum period displaying cervical intraepithelial neoplasia, as well as to analyze the association of bacterial communities present to the families of circular DNA viruses. To achieve this, total DNA was extracted from cervical smear samples from 80 HIV+ women and the bacterial 16S ribosomal RNA gene (V3-V6 region) was amplified by PCR and sequenced in an Illumina HiSeq 2500 platform. After sequencing, the reads were processed and compared with the Greengenes database using open source QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). For the analysis of circular DNA viruses, circular DNA was enriched by rolling circle amplification and sequenced in the HiSeq 2500. The reads were processed and the contigs were reassembled and assigned to viral families using BLASTX against a virus database. We identified through the analysis of 16S two types of communities of bacteria, called CSTs (Community State Types) III and IV according to the type of dominant bacteria. CST III (*L.iners*-dominant) and CST IV (high diversity) were found in 41% and 59% of the samples, respectively. We found no association of CST with the postpartum period (6 or 12 months), HPV (positive or negative) or cytology (normal or lesion). However, five bacterial genera were associated with cervical lesions (*Gardnerella*, *Aerococcus*, *Schlegelella*, *Moryella* and *Bifidobacterium*), with a significant odds ratio (OR) of 40 (2.28-706) for the presence of *Moryella* and 3.5 (1.36-8.9) for *Schlegelella*. Four viral families were identified: Anelloviridae, Genomoviridae, Herpesviridae and Papillomaviridae. The Papillomaviridae family presented high frequency of CST IV for non-16 HPV types (33%) when compared to CST III (14%). In addition, the viral families Herpesviridae, Genomoviridae and Anelloviridae presented a significant association for CST IV. Thus, this study demonstrates that HIV-positive postpartum women have a stable and highly diverse microbiota and are also associated with infections by different viral families. Finally, this is the first study to describe the bacteriome of HIV-positive postpartum women.

Agradecimentos

Dedico esta dissertação à memória do professor Leopoldo de Meis, pessoa que me introduziu na ciência e que me tornou apaixonada por ela. Agradeço-o por todo incentivo, direcionamento e por me mostrar que seguindo nossos sonhos somos capazes de grandes realizações.

Agradeço também ao professor e amigo Wagner Seixas por ter me acompanhado durante minha trajetória no Laboratório de Bioenergética do Instituto de Bioquímica Leopoldo de Meis, durante minha transição ensino médio/graduação, e por sempre ter me incentivado.

Em especial, agradeço ao meu orientador, Marcelo Soares, por ter me recebido no Laboratório de Virologia Humana do Instituto de Biologia da UFRJ, quando eu ainda era aluna de graduação. Agradeço-o por me acompanhar e me orientar durante esta trajetória, e por sempre me estimular e motivar com sua grande dedicação à ciência, sendo um exemplo de pesquisador para mim.

Agradeço a todos do grupo de Oncovirologia, especialmente Raquel e Juliana que tiveram uma participação importante no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço também a todos os pesquisadores do laboratório de genética, em especial ao Héctor Seuáñez Abreu pelas conversas descontraídas na hora de café e por sempre compartilhar com grande prazer e entusiasmo seus conhecimentos sobre a vida e assuntos diversos. Agradeço também a todos os funcionários do prédio (CPQ), pois todos que dedicaram seu tempo e trabalharam para a manutenção da estrutura também tiveram uma participação indireta para execução desta dissertação.

Agradeço também aos participantes do estudo, que doaram amostras para a execução deste.

Agradeço em especial aos alunos da “salinha do aquário” por todas as conversas, descontrações e por toda assistência durante a escrita dessa dissertação.

Por fim, agradeço ao meu noivo Hudson e a minha família por sempre compreenderem minhas ausências e por sempre apoiarem minhas decisões.

*"Seja humilde, pois você é feito de pó.
"Seja nobre, porque você é feito de estrelas"
(Provérbio sérvio)*

Índice

Lista de figuras	xi
Abreviaturas	xiv
1 Introdução	1
1.1 Anatomia da cérvix uterina e o câncer cervical	1
1.2 Infecção e biologia molecular do HPV.....	5
1.3 A identificação de bactérias e o rRNA 16S	10
1.4 O microbioma e o desenvolvimento do câncer	12
1.5 O microbioma vaginal.....	15
1.6 As infecções virais e a microbiota	20
1.7 A microbiota vaginal e o período pós-parto.....	24
2 Objetivos	26
2.1 Objetivo principal:.....	26
2.2 Objetivos secundários:	26
3 Material e Métodos.....	27
3.1 Amostras coletadas.....	27
3.2 Extração de DNA e tipagem do HPV.....	28
3.3 Amplificação e análise do rRNA 16S bacteriano	29
3.4 Amplificação de DNA viral circular e identificação dos vírus	30
3.5 Análises estatísticas.....	32
4 Resultados	33
4.1 Características sócio-demográficas e clínicas da casuística.....	33
4.2 Microbioma e diversidade	35
4.3 Viroma e bacterioma	39
4.4 Análise de biomarcadores de lesão	41
5 Discussão.....	45
6 Conclusões	49
7 Referências	50
8 Anexos	62
8.1 Questionário aplicado as pacientes	62

Lista de tabelas

Tabela 1.1- Cânceres associados à infecção por HIV	23
Tabela 4.2- Informações sócio-demográficas das pacientes do estudo.....	34
Tabela 4.3- Frequência do status de HPV e da citologia cervical no período de seis e 12 meses pós-parto.....	35
Tabela 4.4- Frequência da distribuição das CSTs para citologia cervical, status de HPV e período pós-parto.....	39
Tabela 4.5- Razões de chance (OR) para a ocorrência de bactérias específicas em lesões cervicais.....	43

Lista de figuras

Figura 1.1- O colo do útero e os tipos celulares.....	2
Figura 1.2- Estimativa de 2012 do GLOBOCAN para a incidência de casos do câncer cervical no mundo.....	3
Figura 1.3- Porcentagem da eliminação da infecção por HPV e progressão para lesões e para o câncer cervical.....	5
Figura 1.4- Partícula viral do HPV.....	6
Figura 1.5- Esquema das interações das proteínas virais E6 e E7 com as proteínas celulares p53 e Rb.....	8
Figura 1.6 - Infecção por HPV.....	9
Figura 1.7- O gene rRNA 16S.....	11
Figura 1.8- A microbiota e o desenvolvimento do câncer.....	13
Figura 1.9- Modelo de interações vírus-bactérias no desenvolvimento e progressão do câncer.....	14
Figura 1.10 - Heatmap dos taxa da microbiota vaginal encontradas em 394 mulheres em idade reprodutiva.....	16
Figura 1.11–Grupos de microbiota vaginal.....	17
Figura 1.12- Microbiota vaginal e etnia.....	18
Figura 1.13– Microbiota vaginal e infecção por HIV.....	19
Figura 1.14- Estimativas de 2016 da Organização Mundial da Saúde para o números de pessoas vivendo com HIV no mundo.....	21
Figura 1.15- Modelo de reativação celular do HIV-1 latente por bactérias produtoras de ácido butírico.....	22
Figura 1.16- Mudanças na mucosa e microbiota vaginal decorrentes da produção de estrogênio.....	25
Figura 3.17 - Esquema do fluxo das amostras utilizadas neste estudo.....	28
Figura 4.18 - Heatmap gerado pela clusterização hierárquica não-supervisionada dos taxa definidos.....	36
Figura 4.19–Box plot da análise da diversidade das CSTs usando(a) o índice de Shannon e (b) a diversidade filogenética.....	38
Figura 4.20- Distribuição dos genótipos de HPV nas CSTs	40
Figura 4.21- Análises de associação das CSTs (III e IV) com a infecção por famílias virais de DNA circular.....	41

Figura 4.22- Análise de possíveis biomarcadores de lesão cervical indicados pelo LEfSe.....	42
Figura 4.23- Análise longitudinal da abundância relativa de taxa bacterianos em amostras longitudinais pareadas.....	44

Lista de quadros

Quadro 1.1- Incidência estimada para 2016 dos tipos de câncer em mulheres no Brasil.....	4
Quadro 1.2- Proteínas codificadas pelo papilomavírus humano e suas principais funções.....	7

Abreviaturas

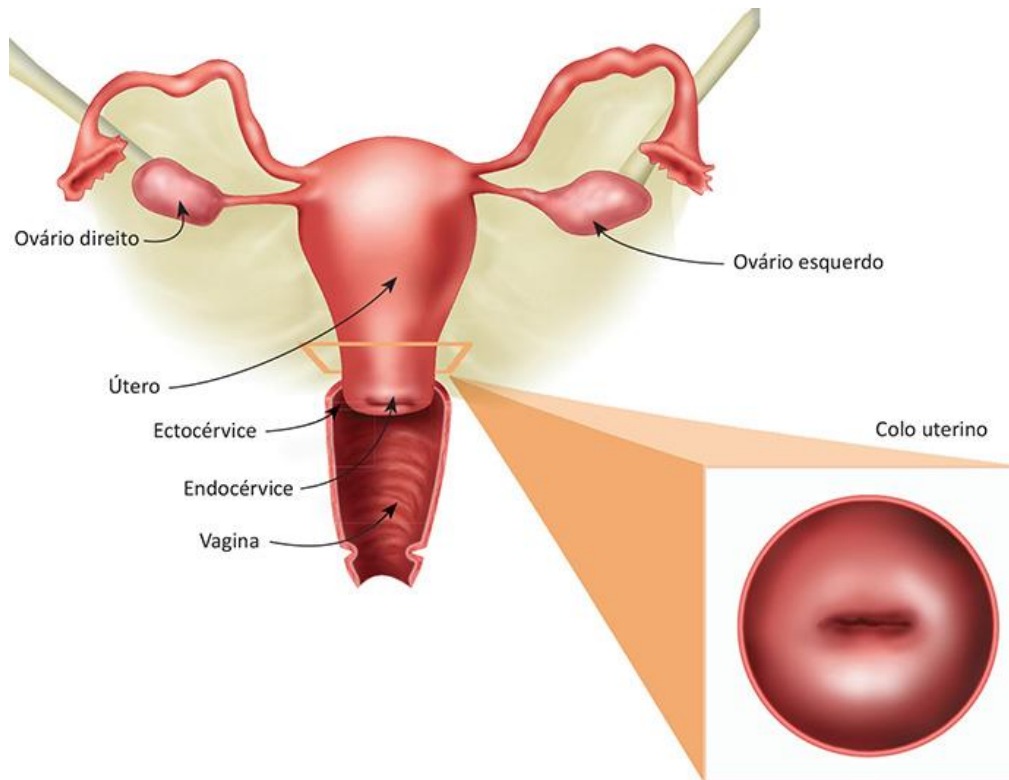
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
CST	Comunidades de bactérias
HSIL	Lesões escamosas intraepiteliais de alto grau
OTU	unidade taxonômica
PD	Diversidade filogenética
LDA	Análise linear discriminante
LEfse	Tamanho do efeito e análise discriminante linear
OR	Razão de chance
rRNA	RNA ribossomal
ng	Nanograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius
ASCUS	Células escamosas atípicas de significância indeterminada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleotídeo
HPV	Papilomavírus humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Kb	Quilobase
LSIL	Lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomol
RCA	Amplificação por círculo rolante
RNA	Ácido ribonucléico
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

1 Introdução

1.1 Anatomia da cérvix uterina e o câncer cervical

O útero é um órgão fibromuscular, localizado na cavidade pélvica. Sua porção inferior, denominada colo do útero, se conecta com a vagina. O colo do útero apresenta forma cilíndrica, com comprimento variável entre 2,5 e 3 cm que se estende para o interior do útero (KURMAN, 1994). Os dois tipos principais de células que constituem o colo do útero são as células escamosas, localizadas na região da ectocérvice, e as células glandulares, localizadas no endocérvice (GRAY; WILLIAMS; BANNISTER, 1995) (Figura 1.1). O local onde estes dois tipos de células se encontram é denominada zona de transformação, que é o local onde o câncer de colo de útero se inicia (Figura 1.1) (GRAY; WILLIAMS; BANNISTER, 1995; STEVENS; LOWE, 2005).

a)



b)

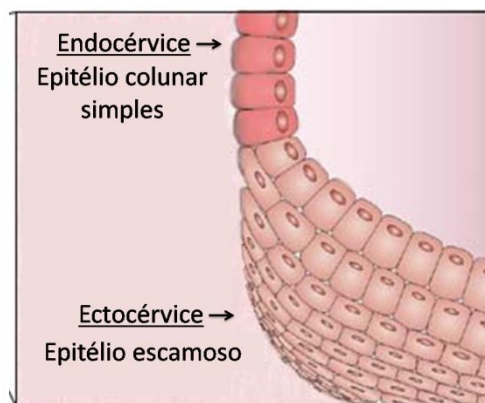


Figura 1.1 - O colo do útero e os tipos celulares. (a) A figura mostra a região vaginal, útero, ovários, e destaca o colo do útero e aponta suas regiões denominadas ectocérvice e endocérvice. (b) A endocérvice é constituída de epitélio colunar simples composto de células glandulares e a ectocérvice é composta de epitélio escamoso. A região de junção entre os dois tipos epiteliais é denominada zona de transformação. Figura modificada de <https://www.vencercancer.org.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-uterino/cancer-de-colo-do-uterio-o-que-e/> e Hladik and McElrath, 2008).

O câncer de colo do útero é o quarto câncer mais comum em mulheres no mundo, com aproximadamente 530 mil novos casos estimados no ano de 2012 (GLOBOCAN, 2012). Cerca de 90% dos casos ocorreram em regiões menos desenvolvidas (GLOBOCAN, 2012). Segundo o último GLOBOCAN de 2012, 54%

dos casos de câncer de colo de útero do mundo ocorreram na Ásia, seguido da África (19%), América Latina e região caribenha (13%), Europa (11%), América do Norte (2,7%) e Oceania (0,4%) (Figura 1.2).

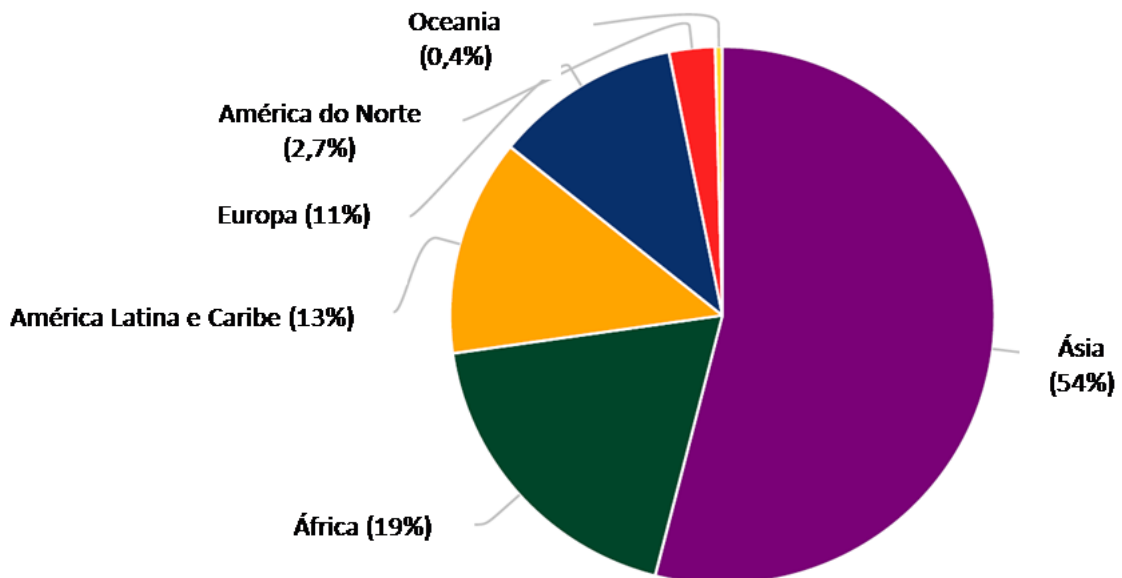


Figura 1.2- Estimativa de 2012 do GLOBOCAN para a incidência de casos do câncer cervical no mundo. Figura modificada de Ferlay *et al.*, 2015.

No Brasil, as taxas de incidência estimadas para 2016 para os tipos de câncer em mulheres indicam o câncer de colo de útero como o terceiro mais frequente. Contudo, sua incidência pode variar dependendo das macrorregiões geográficas (INCA, 2015) (Quadro 1.1). Na região Norte, ele é o mais incidente entre os tipos de câncer que afetam as mulheres. Já nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, ele ocupa a segunda posição, na região Sudeste a terceira e na região Sul a quarta posição (INCA, 2015) (Quadro 1.1).

Quadro 1.3- Incidência estimada para 2016 dos tipos de câncer em mulheres no Brasil

	Brasil	Região Norte	Região Nordeste	Região Centro-Oeste	Região Sudeste	Região Sul
1º	Mama feminina (56,20)	Colo do útero (23,97)	Mama feminina (38,74)	Mama feminina (55,87)	Mama feminina (68,08)	Mama feminina (74,30)
2º	Cólon e Reto (17,10)	Mama feminina (22,26)	Colo do útero (19,49)	Colo do útero (20,72)	Cólon e Reto (22,66)	Cólon e Reto (23,27)
3º	Colo do útero (15,85)	Cólon e Reto (5,89)	Cólon e Reto (8,77)	Cólon e Reto (16,93)	Colo do útero (11,30)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (20,61)
4º	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,54)	Estômago (5,82)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (7,24)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (9,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,56)	Colo do útero (15,17)
5º	Estômago (7,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (5,07)	Estômago (6,73)	Ovário (6,96)	Corpo do útero (9,58)	Estômago (8,71)

Valor por 100 mil habitantes

Fonte: INCA 2015.

Apesar das altas taxas de incidência, é possível rastrear as lesões precursoras do câncer de colo de útero (lesões intraepiteliais cervicais) através da realização do teste de Papanicolau, que segundo as diretrizes brasileiras deve ser realizado em mulheres de 25 a 60 anos de idade ou que já tenham iniciado a atividade sexual (INCA, 2011). Além disto, é recomendado o acompanhamento de três em três anos, após dois exames negativos. Entretanto, dado o risco de desenvolvimento de lesão em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), é recomendado o acompanhamento semestral; se o resultado da citologia for normal, deve-se manter o acompanhamento anual se houver imunossupressão (INCA, 2011).

As lesões precursoras são diagnosticadas através do exame citológico do esfregaço cervical proveniente do exame do Papanicolau e são classificadas de acordo como sistema de Bethesda (SOLOMON et al., 2002). As lesões podem ser classificadas como lesões de baixo (LSIL, do inglês *low-grade squamous intraepithelial lesion*) ou de alto grau (HSIL, do inglês *high-grade squamous intraepithelial lesion*).

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é uma causa necessária para o desenvolvimento do câncer de colo de útero, mas não suficiente, dado que apenas

uma porção da população infectada desenvolve o câncer. Este fato ocorre devido à eliminação da infecção viral pelo sistema imune (SHULZHENKO et al., 2014). (Figura 1.3).

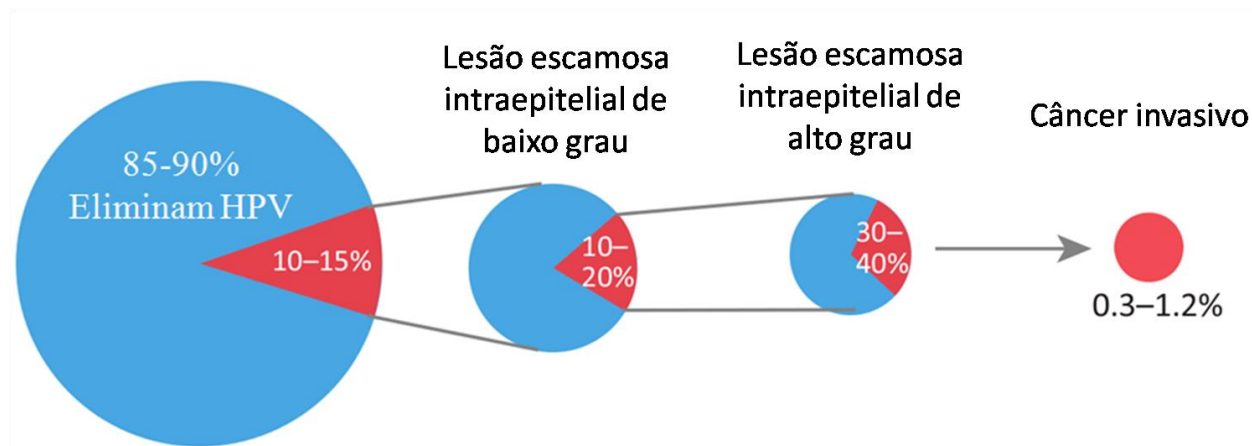


Figura 1.3- Porcentagem da eliminação da infecção por HPV e progressão para lesões e para o câncer cervical. Figura modificada de Shulzhenko *et al.*, 2014.

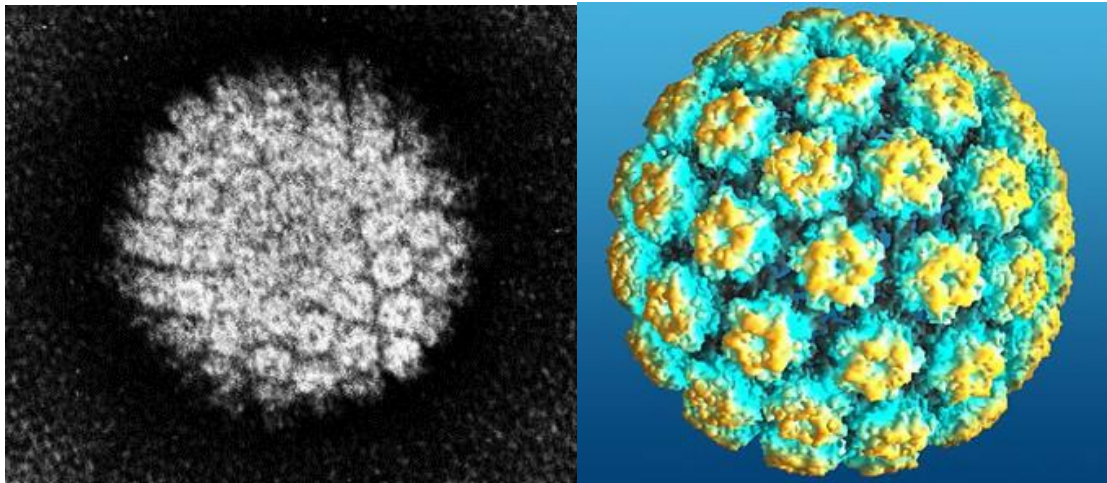
1.2 Infecção e biologia molecular do HPV

O HPV é capaz de infectar as células epiteliais e promover o desenvolvimento do câncer cervical. Existem mais de 200 tipos de HPV (DE VILLIERS et al., 2004). Os dois principais gêneros de HPV são o Alfa- e o Betapapilomavírus, responsáveis por aproximadamente 90% das infecções em humanos (DOORBAR, 2006). O gênero Alfa corresponde a um grande grupo de vírus e contém os tipos de HPV que infectam a mucosa. Mais de 30 diferentes tipos de HPV são conhecidos por infectar o epitélio cervical, que podem levar ao desenvolvimento do câncer cervical (DOORBAR, 2006), sendo divididos em HPVs de alto e baixo risco (DE VILLIERS et al., 2004; BOUVARD et al., 2009). Os tipos de baixo risco em geral são associados ao desenvolvimento de verrugas anogenitais e os de alto risco estão associados ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais e ao câncer (DE VILLIERS et al., 2004). O desenvolvimento da infecção persistente é um fator chave para o desenvolvimento do câncer cervical (BRAATEN; LAUFER, 2008).

O câncer cervical é o tipo de câncer onde a infecção por HPV é responsável por virtualmente 100% dos casos de câncer cervical (WALBOOMERS et al., 1999). O HPV16 é o tipo de alto risco mais frequente, seguido pelo tipo 18, e ambos são responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical (CLIFFORD et al., 2003; BRAATEN; LAUFER, 2008).

Os HPVs são vírus não-envelopados, com genoma constituído de dupla-fita de DNA circular de aproximadamente 8kb (DOORBAR et al., 2015) (Figura 1.4). Os HPVs codificam as proteínas virais E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 e L2 (Quadro 1.2). A proteína estrutural L1 é codificada pelo gene *L1*, que é o gene mais conservado entre os vírus da família Papillomaviridae, o que permite que o gene seja utilizado na identificação dos tipos de HPV (DE VILLIERS et al., 2004).

a)



b)

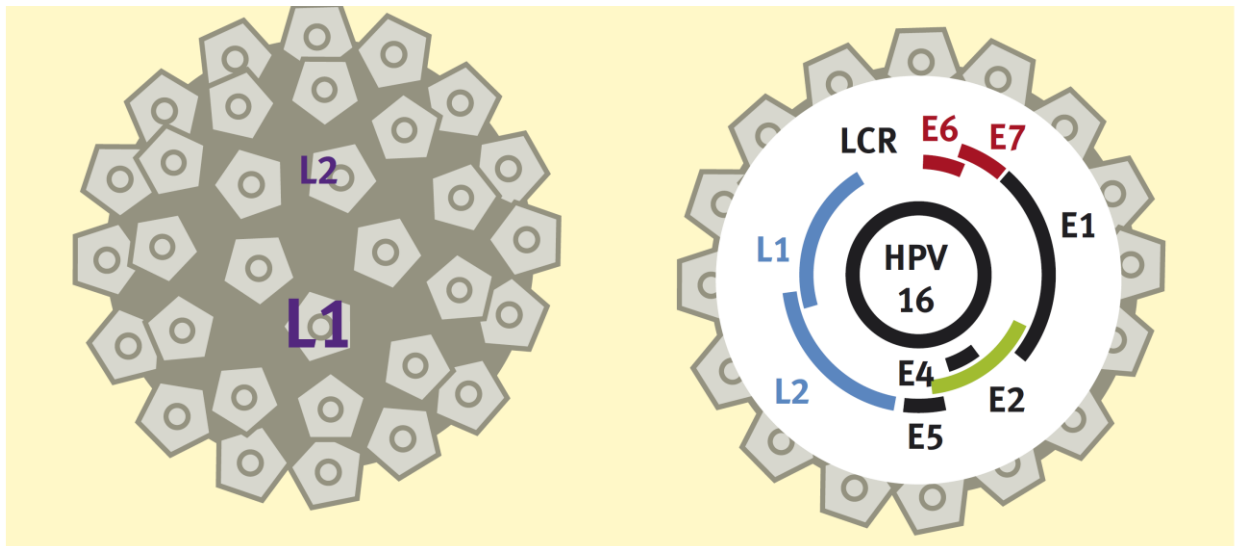


Figura 1.4- Partícula viral do HPV. (a) Imagem de microscopia eletrônica da partícula (a direita) e representação gráfica da partícula viral (a esquerda). (b) A figura ilustra as proteínas que compõem o capsídeo viral e os genes que codificam as diferentes proteínas virais. Figura modificada de *Laboratory of Tumor Virus Biology* 1986; Jane George n.d.; Tristram and Fiander 2007.

Quadro 1.4- Proteínas codificadas pelo papilomavírus humano e suas principais funções

Proteína	Característica
E1	Responsável pela replicação viral
E2	Regula a transcrição viral e replicação
E4	Interage com as proteínas do citoesqueleto
E5	Regula negativamente o MHC de classe 1
E6	Liga-se à proteína p53
E7	Liga-se à proteína Rb (retinoblastoma)
L1 e L2	Proteínas que formam o capsídeo viral

Modificado de Tristram and Fiander 2007.

Os genes E6 e E7 são oncogenes e codificam as proteínas E6 e E7 que manipulam diferentes vias celulares para promover a replicação viral (Figura 1.5). Entretanto, a inativação de pontos de controle do ciclo celular leva à instabilidade genômica, promove o acúmulo de mutações em genes celulares e leva à progressão para o câncer (EL et al., 2012).

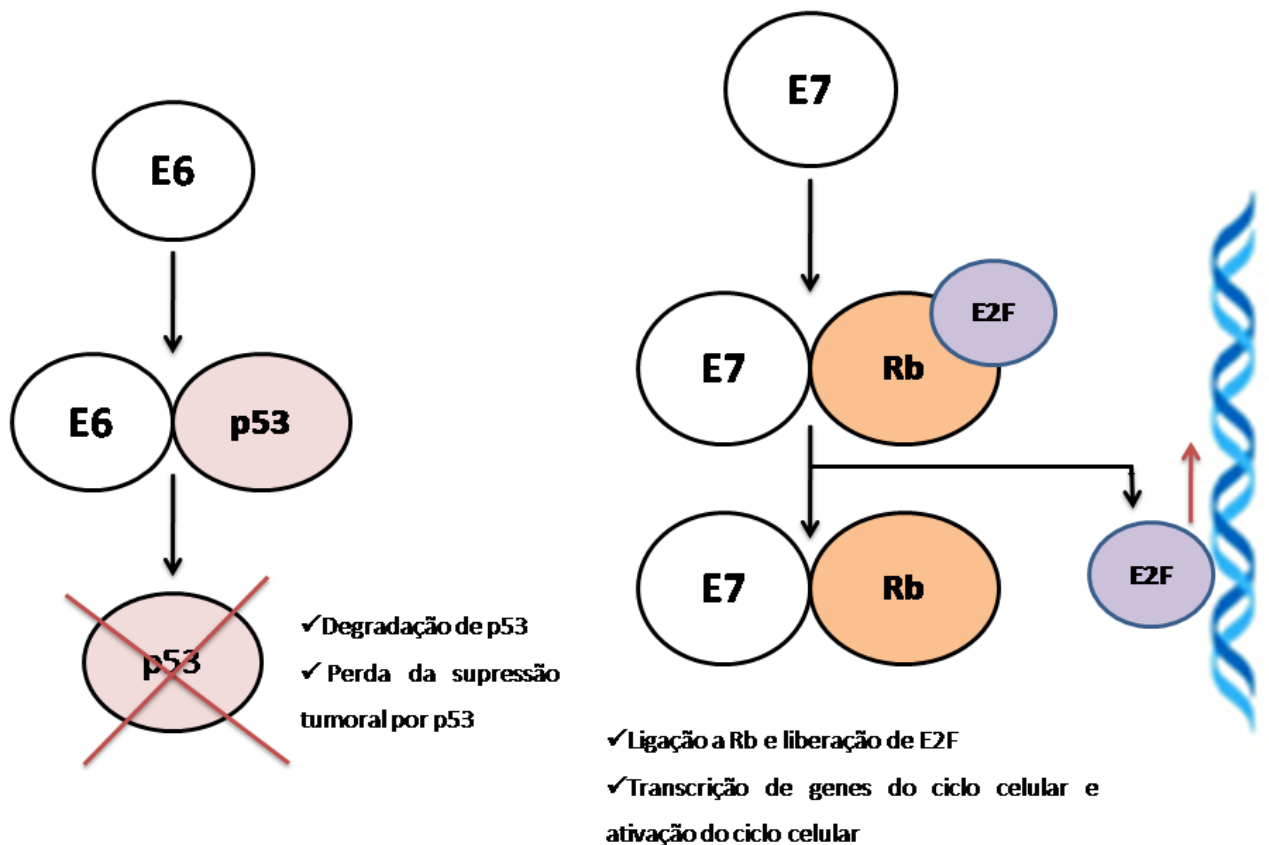


Figura 1.5- Esquema das interações das proteínas virais E6 e E7 com as proteínas celulares p53 e Rb. A proteína E6 promove a degradação de p53 e a proteína E7 se liga a proteína Rb, que normalmente se liga a E2F. A ligação de E7 à proteína Rb promove a liberação de E2F, estimulando a proliferação celular. Figura modificada de El et al. 2012.

O HPV infecta as células da camada basal do epitélio através de micro-abrasões no tecido. Quando não eliminados, os vírus estabelecem uma infecção persistente dentro destas células (Figura 1.6). À medida que as células se diferenciam e migram para a superfície do epitélio, existe um aumento dos níveis da replicação e expressão gênica viral (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Os vírus são montados nas células da superfície do epitélio e liberados para o meio extracelular (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007) (Figura 1.6).

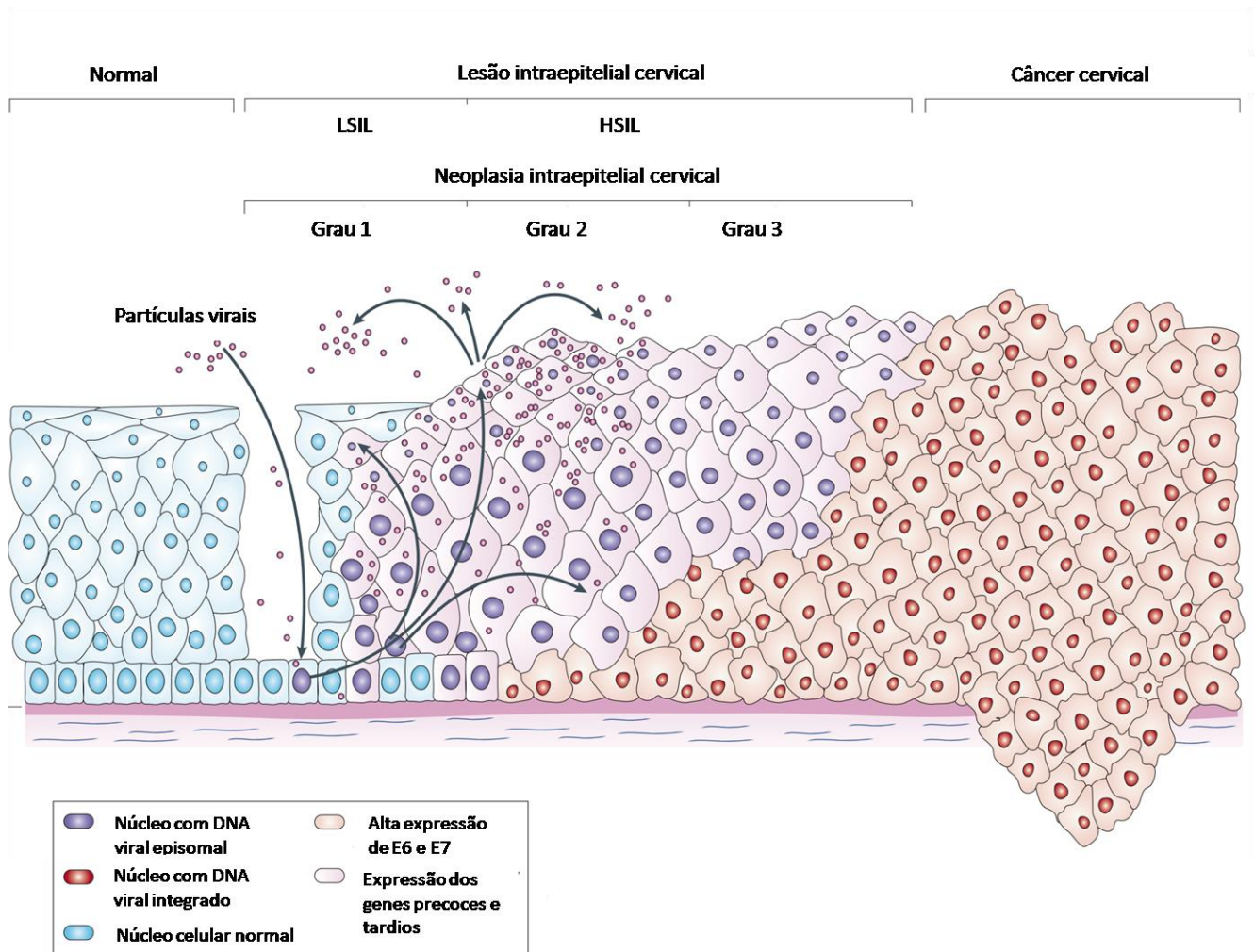


Figura 1.6 - Infecção por HPV. O HPV infecta as células da membrana basal através de micro-abrasões no epitélio cervical. Após entrar nas células, inicia-se a expressão das proteínas precoces virais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7). Estas proteínas se ligam à origem de replicação do vírus, levando à replicação do DNA episomal viral (núcleos roxos), à transcrição dos genes virais e estimulam a proliferação celular. Com a diferenciação da célula infectada e a migração da célula para a camada superior do epitélio, inicia-se a expressão das proteínas estruturais (L1 e L2) e a montagem das partículas virais. Os diferentes graus de lesões desenvolvidas estão mostrados no topo da figura. Figura modificada de Woodman, Collins, and Young 2007.

A infecção por um HPV oncogénico não promove por si só o desenvolvimento do câncer cervical. Aproximadamente 80% a 90% das infecções são eliminadas (SHULZHENKO et al., 2014). Entretanto, fatores, tais como, fumo, uso de anticoncepcional, paridade, número de parceiros sexuais, são fatores classicamente associados à persistência da infecção por HPV (CASTELLSAGUÉ; BOSCH; MUÑOZ, 2002; CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003; ZITKUTE; BUMBULIENE, 2016). Adicionalmente, recentes trabalhos demonstram que alterações da microbiota

cervical estão associadas a uma chance maior em adquirir o HIV e o HPV, assim como a um risco aumentado de desenvolvimento de lesões cervicais (PETROVA et al., 2013; OH et al., 2015; KYRGIU; MITRA; MOSCICKI, 2017).

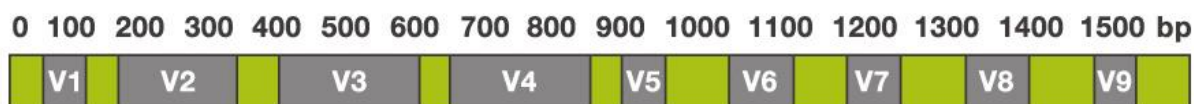
1.3 A identificação de bactérias e o rRNA 16S

Os seres humanos constituem um ecossistema contendo trilhões de microorganismos que coevoluíram com eles, criando assim uma complexa rede de interações fisiológicas (FOSTER et al., 2017; ZENG et al., 2017). A maioria dos microorganismos residem no intestino e têm uma profunda influência na fisiologia e saúde de seu hospedeiro (Bäckhed *et al.*, 2005). Sendo assim, tem se aumentado nos últimos anos o interesse na identificação dos microorganismos que compõem a microbiota normal e alterada de diferentes sítios anatômicos humanos.

Durante muitos anos, a identificação de novas espécies de bactérias foi realizada através do cultivo e isolamento, o que era considerado o padrão-ouro para identificação das novas espécies. A identificação por meio de cultivo começou no ano de 1876, quando Robert Koch utilizou esta metodologia para isolar e identificar o agente responsável pelo Anthrax (BLEVINS; BRONZE, 2010). Após a cultura e isolamento, as bactérias eram identificadas com base na morfologia, coloração diferencial, tipo de meio de cultura de crescimento, entre outros aspectos. Entretanto, o número de bactérias capazes de serem cultivadas e isoladas por esta metodologia é limitado, não sendo capaz de representar a complexidade de bactérias existente em uma única amostra. Em 1977, Carl R. Woese e George E. Fox publicaram o primeiro trabalho utilizando o gene do rRNA 16S, mostrando que bactérias apresentavam relações filogenéticas e que podiam ser identificadas com base na filogenia do gene (WOESE; FOX, 1977). Este trabalho foi revolucionário e atualmente este gene é utilizado amplamente para a identificação molecular das espécies de bactérias (WOESE; FOX, 1977; WOESE, 1987).

O gene do rRNA 16S tem aproximadamente 1.500pb de tamanho e contém nove regiões variáveis (V1-V9) intercaladas por regiões conservadas que permitem a amplificação de diferentes ordens de bactérias utilizando iniciadores universais (HUGENHOLTZ; PACE, 1996) (Figura 1.7).

a)



b)

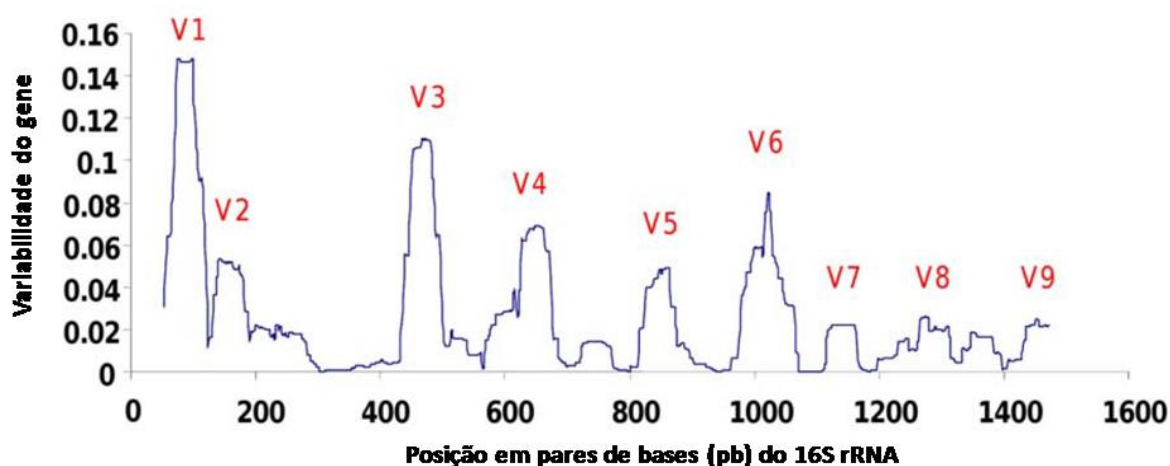


Figura 1.7- O gene rRNA 16S. (a) O gene apresenta nove regiões variáveis (V1 – V9), destacadas na cor cinza. As regiões variáveis são intercaladas por regiões conservadas, destacadas na cor verde. (b) O gráfico mostra a frequência de variação do gene por pares de bases e ilustra todas as regiões variáveis (V1 – V9) do gene. Figura modificada de Bodilis et al. 2012.

Por muitos anos, a amplificação do gene 16S foi seguida de clonagem e posterior sequenciamento por Sanger. Embora estas metodologias possam fornecer informações da composição de bactérias, é necessária a geração de conjuntos de dados grandes o suficiente para permitir acessar a grande diversidade de bactérias presentes (CHO; BLASER, 2012). Com o desenvolvimento de tecnologias no século 21 capazes de gerar grandes volumes de dados de sequências com rapidez e precisão, hoje é possível caracterizar a diversidade de microorganismos presentes em diferentes sítios anatômicos (PETERSON et al., 2009; CHO; BLASER, 2012).

O primeiro grande projeto a caracterizar a diversidade de microorganismos em diferentes sítios anatômicos foi o *Human Microbiome Project* (HMC) (MCGUIRE et al., 2008; PETERSON et al., 2009). O HCM foi estabelecido em 2008 e analisou amostras de 242 pessoas saudáveis. Esta iniciativa contribuiu enormemente para o conhecimento da composição do microbioma em diferentes partes do corpo de pessoas saudáveis, incluindo o microbioma vaginal.

1.4 O microbioma e o desenvolvimento do câncer

O conceito do microbioma humano foi sugerido pela primeira vez em 2001 por Joshua Lederberg, que cunhou o termo (JOSHUA LEDERBERG, 2001; PETERSON et al., 2009). O microbioma se refere à comunidade de microorganismos comensais, simbióticos e patogênicos, que compartilham um mesmo espaço, formando uma complexa interação. Alterações da homeostase do microbioma humano podem prejudicar as relação de simbiose e promover alterações fisiológicas no indivíduo, levando ao desenvolvimento de doenças, como o câncer (GARRETT, 2015). Recentes estudos demonstram que a microbiota apresenta um papel importante no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer e sugerem diferentes mecanismos de carcinogênese promovidos pela microbiota (GARRETT, 2015; BHATT; REDINBO; BULTMAN, 2017; RAJAGOPALA et al., 2017) (Figura 1.8). Adicionalmente, estudos também demonstram que a microbiota exerce um importante papel no curso das infecções virais, como nas infecções por HPV e HIV (MITRA et al., 2016; GOSMANN et al., 2017; VYSHENSKA et al., 2017).

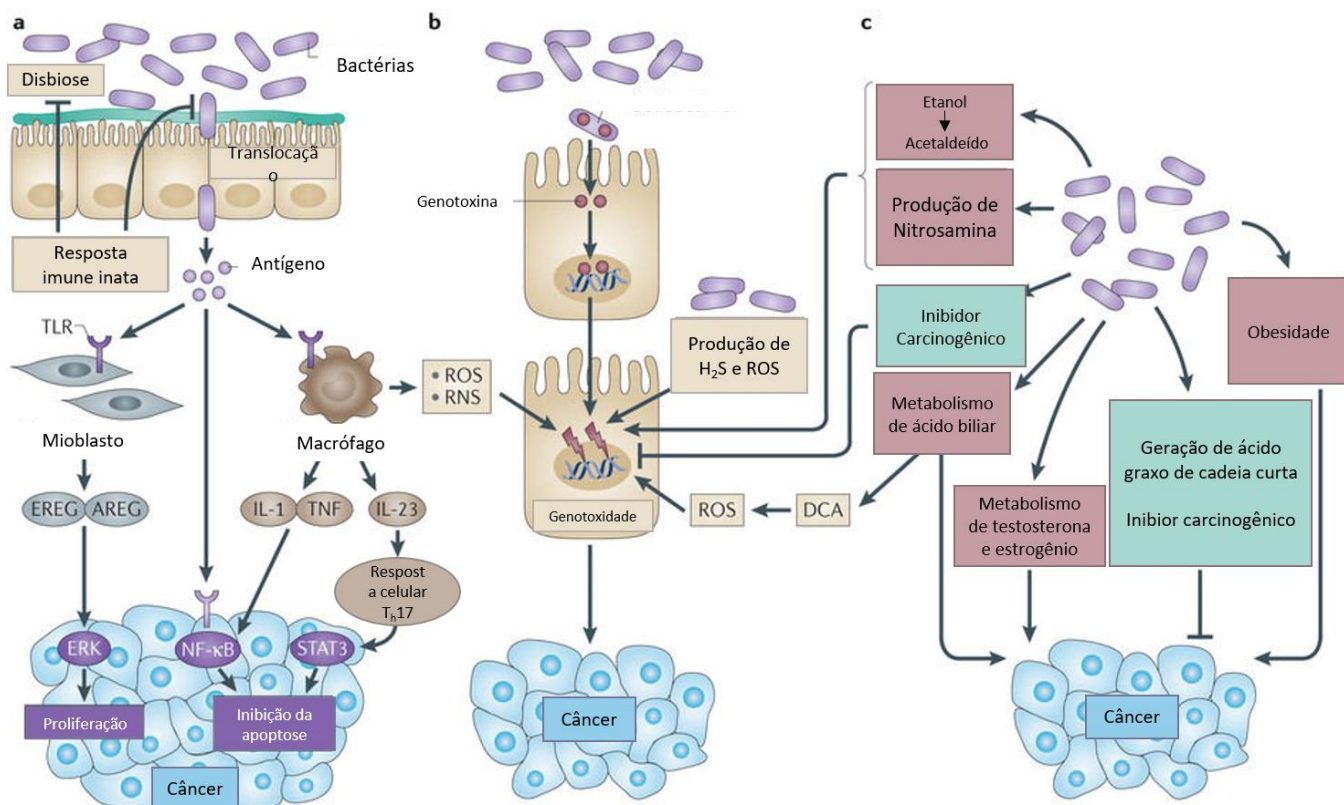


Figura 1.8- A microbiota e o desenvolvimento do câncer. O microbioma promove a carcinogênese através de diferentes mecanismos. (a) Alterações nos mecanismos de defesa podem favorecer a translocação microbiana, ocasionando um aumento na produção de citocinas e ativando vias em diferentes células, tais como vias de prevenção de apoptose e proliferação. (b) A produção de genotoxinas tais como colibactina e CDT, mediada por bactérias, induz danos ao DNA. Além disto, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) liberadas pelas células do sistema imune, como macrófagos, assim também como a produção de sulfato de hidrogênio (H₂S) pela microbiota, também causam danos ao DNA. (c) Adicionalmente, os produtos metabólicos produzido pela microbiota podem promover o desenvolvimento de câncer. As caixas verdes representam efeitos antitumorais mediado pela microbiota. Figura modificada de Schwabe e Jobin 2013.

As infecções virais são responsáveis por 15-20% do total de cânceres no mundo (LUO; OU, 2015). Entre os vírus que podem causar câncer estão o HIV, o vírus Epstein-Barr (EBV), o herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) ou herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8), o HPV e os vírus das hepatites B e C (LUO; OU, 2015). Estes vírus usam diferentes estratégias que levam ao desenvolvimento do câncer por mecanismos diretos e indiretos (VYSHENSKA et al., 2017). Podem afetar diretamente a maquinaria celular (como o HPV) e/ou, através de um mecanismo indireto, podem inibir o sistema imune do hospedeiro e levar ao desenvolvimento do

câncer (como o HIV) (VYSHENSKA et al., 2017). É conhecido que alguns tipos de câncer requerem a infecção viral, como o câncer cervical. Contudo, não é totalmente conhecido porque muitas pessoas infectadas pelo HPV eliminam a infecção e não desenvolvem o câncer. Recentemente, tem sido proposto o papel da microbiota cervical na infecção pelo HPV (MITRA et al., 2016).

Atualmente, dois modelos de interação vírus-bactéria são propostos (VYSHENSKA et al., 2017) (Figura 1.9). O primeiro modelo proposto sugere que a microbiota influencia diretamente a infecciosidade do vírus através da produção de bioprodutos, e isto pode modular a interação vírus-hospedeiro positivamente (Figura 1.9a). O segundo modelo propõem que a interação hospedeiro-bactéria altera a expressão gênica do hospedeiro e, subseqüentemente, ativa a expressão das proteínas virais e promove a tumorigênese associada à infecção viral (Figura 1.9b). É importante ressaltar que a microbiota é também capaz de proteger o organismo de infecções virais, inibindo a entrada do vírus nas células. Estes mecanismos variam dependendo da composição da microbiota (VYSHENSKA et al., 2017).

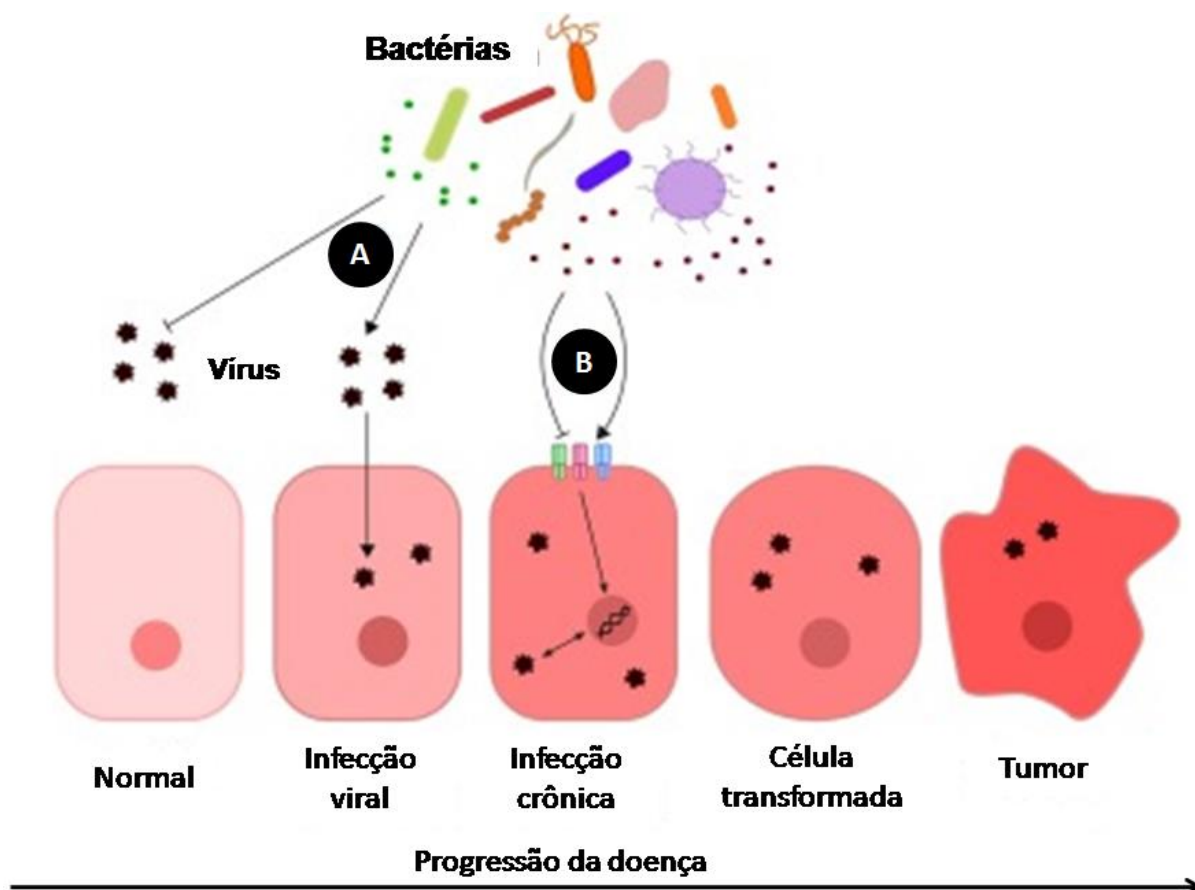


Figura 1.9– Modelo de interações vírus-bactérias no desenvolvimento e progressão do câncer: (a) interação direta entre bactérias e vírus, resultando em inibição ou promoção de infecção viral na célula hospedeira; (b) interação indireta entre bactérias e vírus mediada

pela resposta do hospedeiro, através da ativação da resposta celular para produtos ou proteínas da bactéria. Figura modificada de Vyshenska et al. 2017.

A microbiota vaginal saudável é a primeira linha de defesa contra infecções. A microbiota produz ácido lático e peróxido de hidrogênio que representam fatores protetores contra infecções (O'HANLON; MOENCH; CONE, 2013; MITRA et al., 2016).

1.5 O microbioma vaginal

O microbioma cervicovaginal de mulheres saudáveis é composto por aproximadamente 300 taxa de bactéria que pode ser clusterizado e dividido em cinco grupos (*Community State Types* (CST)) com base na abundância das espécies (RAVEL et al., 2011) (Figura 1.10). O nome CST foi atribuído por Ravel em 2011, para descrever os clusters de bactérias observados nas amostras analisadas. Os clusters são denominados de I-V, de acordo com as bactérias dominantes (RAVEL et al., 2011). Os clusters I, II, III e V, apresentam *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus Iners* e *Lactobacillus jensenii* como espécies dominantes, respectivamente. O cluster IV é descrito como o cluster de alta diversidade, apresentando alta frequência de espécies anaeróbicas, tais como *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Atopobium* and *Prevotella*. O desbalanço na composição da microbiota vaginal, dominante em *Lactobacillus* para o perfil de alta diversidade, é denominado disbiose bacteriana (RAVEL et al., 2011; FETTWEIS et al., 2014; VAN DE WIJGERT; JESPERS, 2017). Algumas mulheres com disbiose desenvolvem sintomas, tais como corrimento vaginal anormal, inflamação, odor e prurido, sendo caracterizado nestas condições o estado de vaginose bacteriana (WHITE et al., 2011; MA; FORNEY; RAVEL, 2012). Apesar de algumas mulheres apresentarem sintomas, grande parte delas são assintomáticas (FETTWEIS et al., 2014). Entretanto, ambas as mulheres sintomáticas e assintomáticas apresentam maior chance de adquirir HIV, HPV e outras infecções (VAN DE WIJGERT; JESPERS, 2007).

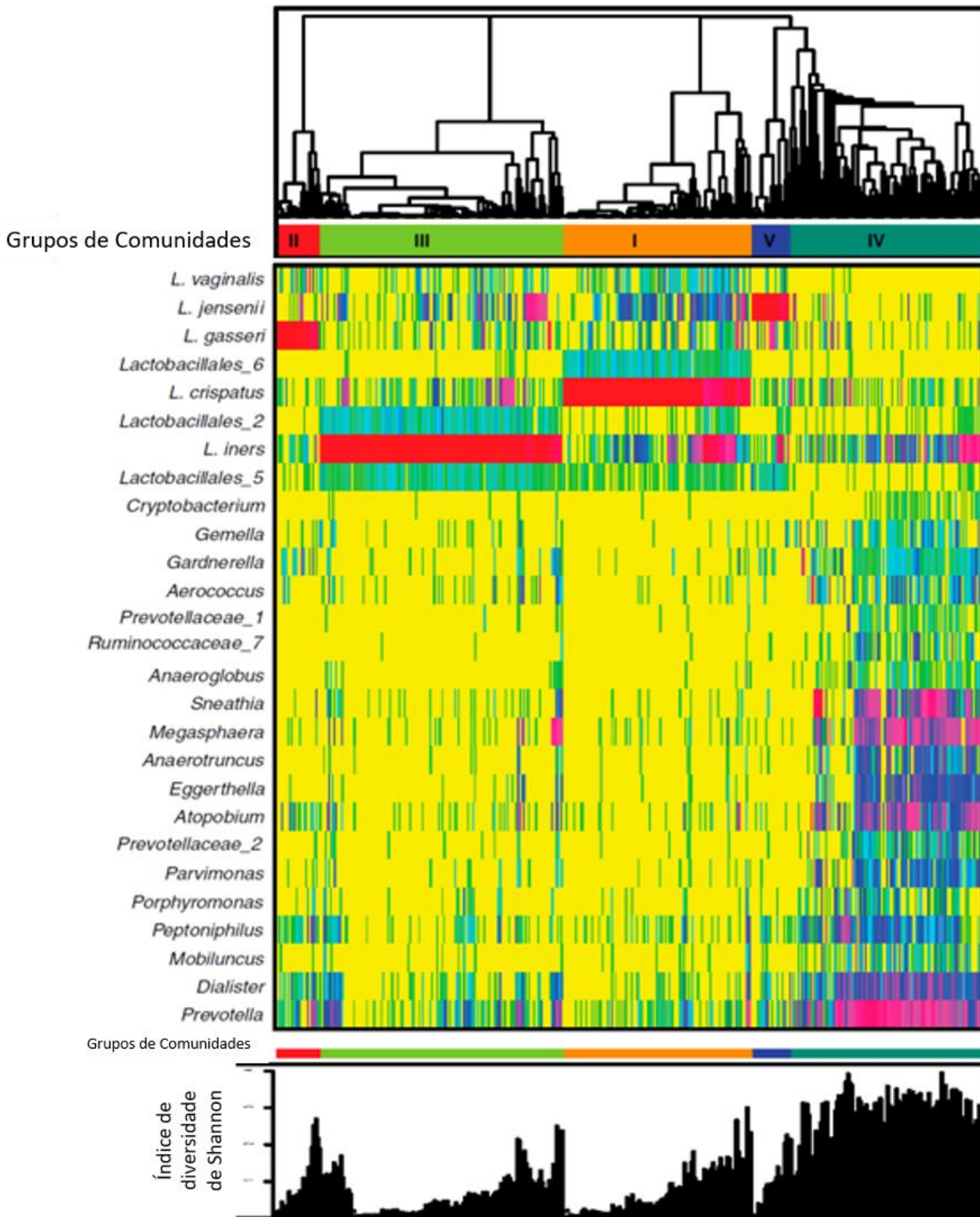


Figura 1.10 - Heatmap dos taxa da microbiota vaginal encontradas em 394 mulheres em idade reprodutiva. A clusterização das amostras com base na composição das espécies e abundância das comunidades bacterianas vaginais demonstra a formação de cinco grupos de comunidades distintos (I – V), denominados de CSTs (do inglês, *Community State Types*). O índice de diversidade de Shannon calculado para 394 comunidades vaginais é demonstrado. Figura modificada de Ravel et al. 2011.

Os *Lactobacillus* apresentam alta abundância em amostras de mulheres saudáveis e foram descritos pela primeira vez em 1892 por Döderlein (MARTIN, 2012). Os *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii* produzem ácido lático e H_2O_2 , o que restringe o crescimento de outras bactérias, contribuindo para manutenção da microbiota saudável (TACHEDJIAN et al., 2017). O *L. iners* é considerado uma espécie de transição da microbiota saudável para a não-saudável, de alta diversidade (TACHEDJIAN et al., 2007) (Figura 1.11). O que distingue o *L. iners* dos outros *Lactobacillus* é a sua baixa produção de lactato e sua incapacidade em produzir H_2O_2 , o que pode levar o estabelecimento de outras bactérias em mulheres *L. iners*-dominantes, como bactérias relacionadas à vaginose bacteriana (PETROVA et al., 2007; TACHEDJIAN et al., 2007).

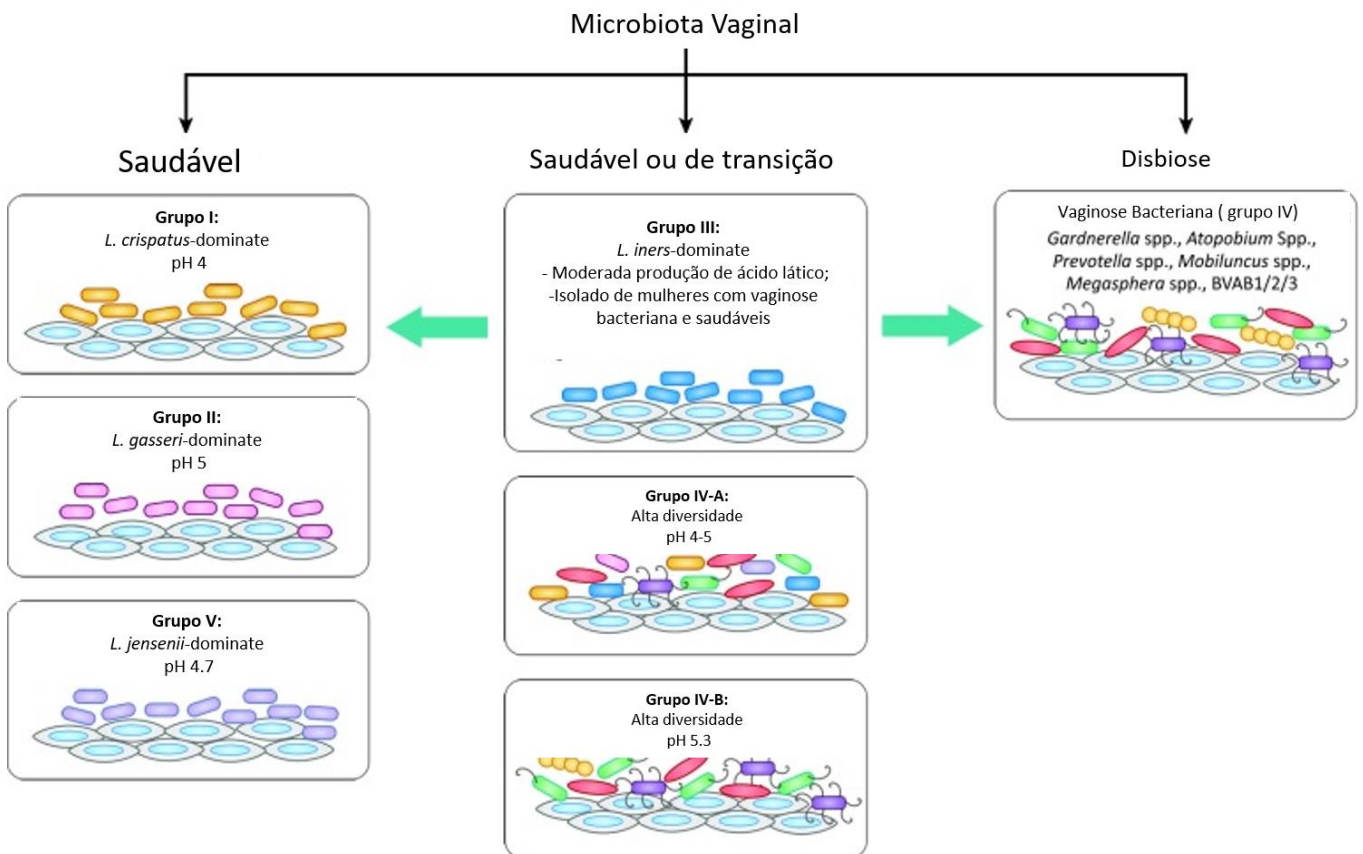


Figura 1.11- Grupos de microbiota vaginal. A microbiota vaginal pode ser dividida essencialmente em cinco grupos (I-V), destacados na figura. Estes grupos são divididos em estado saudável, de transição e de disbiose. O grupo III, dominante em *L. iners*, é representado como microbiota em transição entre estados saudáveis e de vaginose bacteriana. Figura modificada de Petrova et al. 2017.

A proporção dos clusters da microbiota vaginal varia de acordo com a

ancestralidade das mulheres (RAVEL et al., 2011; FETTWEIS et al., 2014; GAO et al., 2015) (Figura 1.12). Mulheres de origem europeia apresentam maior frequência do cluster I (*L. crispatus*-dominante). Mulheres de origem asiática apresentam maior proporção do cluster III (*L. iners*-dominante) e mulheres africanas apresentam maior prevalência do cluster IV (alta diversidade). O cluster IV é associado ao maior risco de adquirir HPV, HIV e desenvolvimento de lesão intraepitelial cervical (MITRA et al., 2016; GOSMANN et al., 2017).

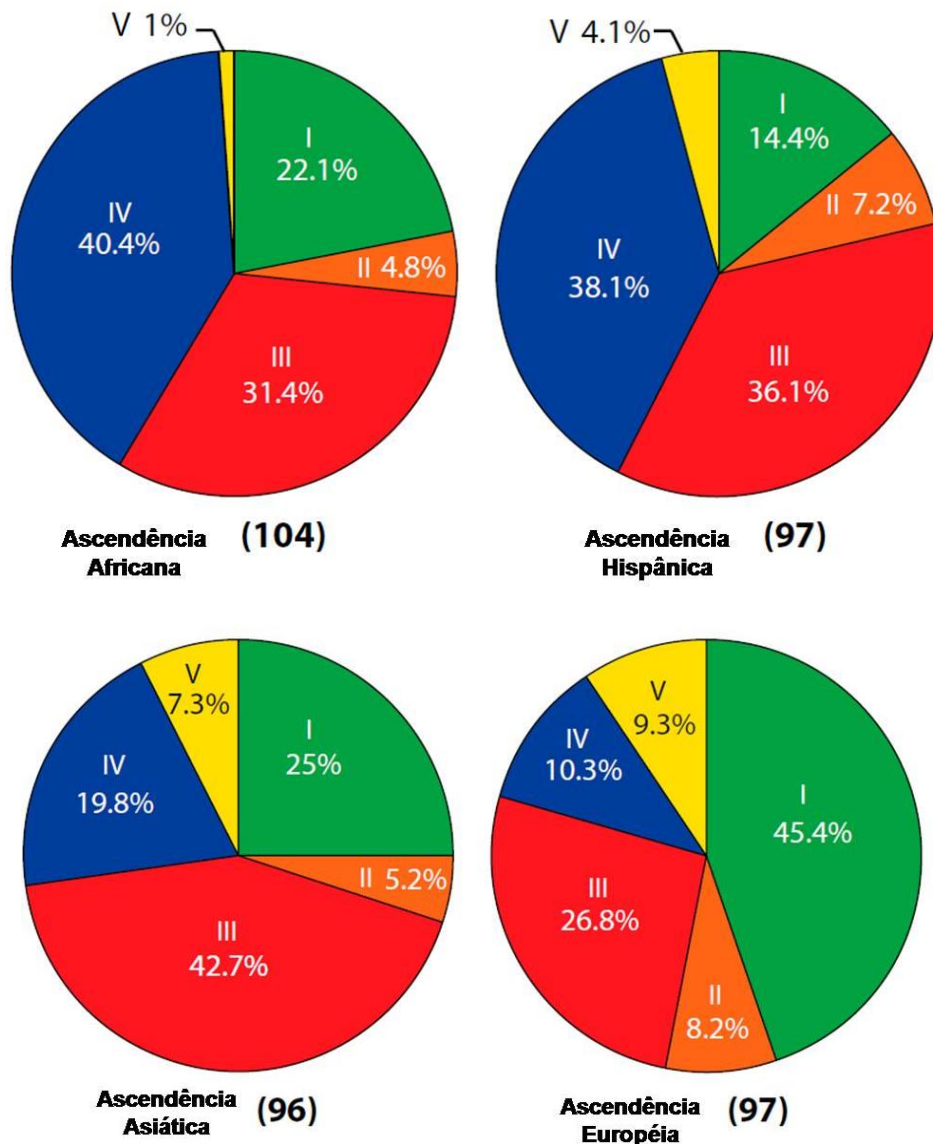


Figura 1.12- Microbiota vaginal e etnia. Gráficos em pizza dos grupos da microbiota vaginal dentro dos quatro grupos étnicos (asiático, europeu, africano e hispânico). Os clusters I, II, III e V, apresentam *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. Iners* e *L. jensenii*, como espécies dominante, respectivamente. O cluster IV é descrito como o cluster de alta diversidade, apresentando alta frequência de espécies anaeróbicas, tais como *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Atopobium* e *Prevotella*. Figura modificada de Ravel et al. 2011.

Estudos recentes demonstram que mulheres com o cluster IV apresentam maior produção de citocinas pró-inflamatórias, o que aumenta o recrutamento de células $CD4^+CCR5^+$ ativadas para a região da mucosa vaginal, favorecendo a infecção pelo HIV (ANAHTAR et al., 2015; GOSMANN et al., 2017) (Figura 1.13).

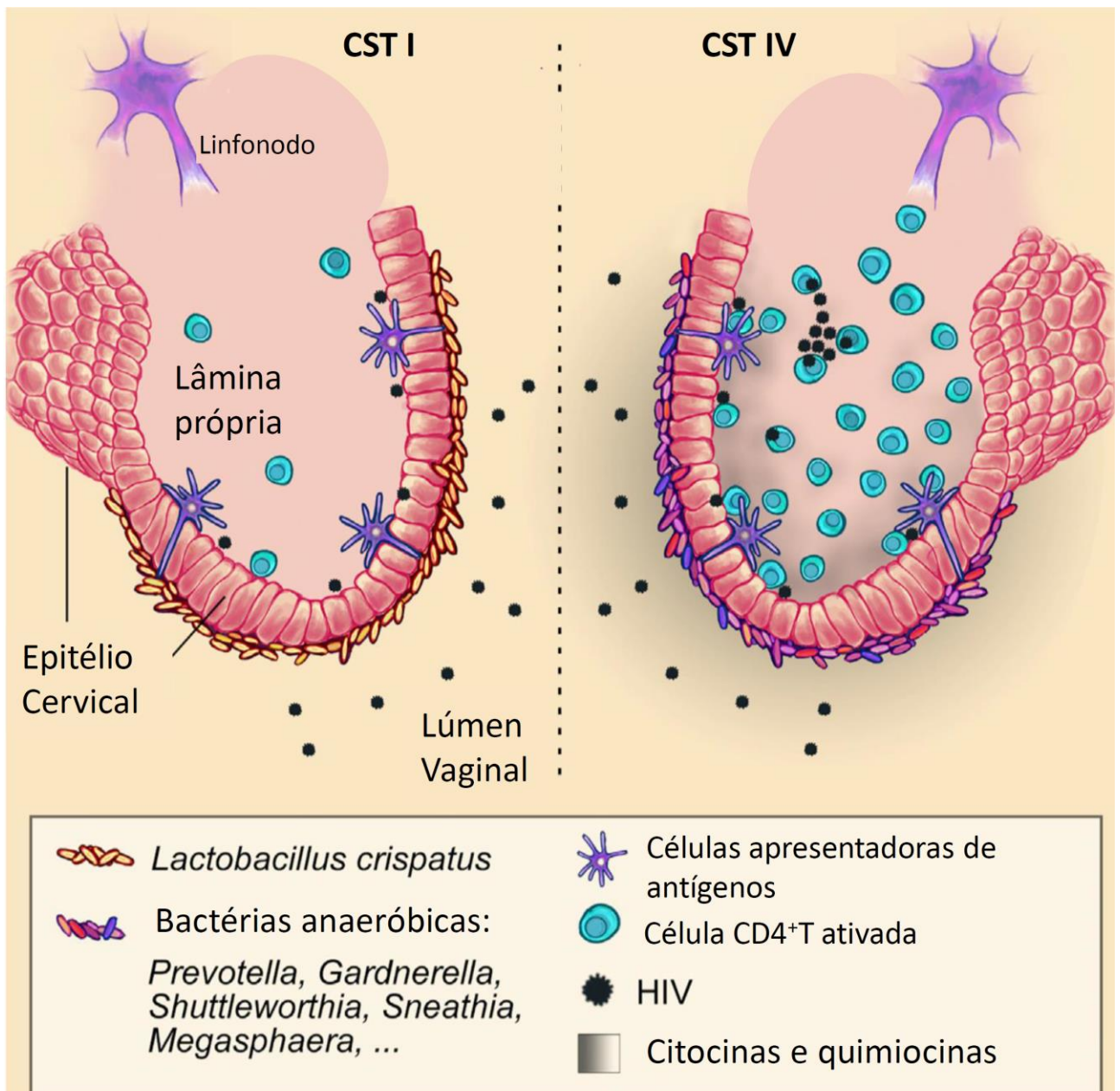


Figura 1.13– Microbiota vaginal e infecção por HIV. Os grupos de microbiota vaginal (CST I e CST IV) representados apresentam diferenças na produção de citocinas pelas células cervicais. CST IV apresenta alta produção de citocina e recrutamento de células $CD4^+$, como representado. Modificado de GOSMANN et al., 2017.

Além disso, a produção de citocinas como o TNF-alfa é associada a danos na parede do epitélio, o que poderia favorecer a maior infecção por HPV (AUDIRAC-

CHALIFOUR et al., 2016). A presença do cluster IV também está associada ao maior risco de desenvolvimento de infecções persistentes e consequentemente de lesão (MITRA et al., 2016). Estudos transversais demonstram uma relação negativa entre a infecção por HPV e lesões cervicais com os clusters dominantes por *Lactobacillus*, com exceção de *L. iners*. A microbiota *L. iners*-dominante tem sido associada também a uma alta frequência da infecção por HIV, HPV e herpesvírus humano tipo 2 (HSV-2) (PETROVA et al., 2017).

Um estudo longitudinal comparando a microbiota de mulheres HPV-positivas e negativas demonstrou que a presença de *L. gasseri* está positivamente associada à eliminação do HPV (BROTMAN et al., 2014). Entretanto, os mecanismos pelos quais a microbiota está associada ao aumento da infecção persistente e eliminação do HPV ainda são desconhecidos.

1.6 As infecções virais e a microbiota

Atualmente, 36,7 milhões de pessoas vivem com HIV no mundo (Figura 1.13) (WHO, 2017). Em 2016, registrou-se 1,8 milhões de novos casos de infecção por HIV e um milhão de óbitos de pessoas HIV-positivas (WHO, 2017). A África é o continente com o maior número de pessoas infectadas por HIV, existindo no continente 25,6 milhões de casos estimados (WHO, 2017). A segunda região afetada pela infecção é o sudeste asiático, com 3,5 milhões de casos, seguido do continente americano, com 3,3 milhões de casos (WHO, 2017).

36.7 milhões
de pessoas
vivendo com HIV
no mundo

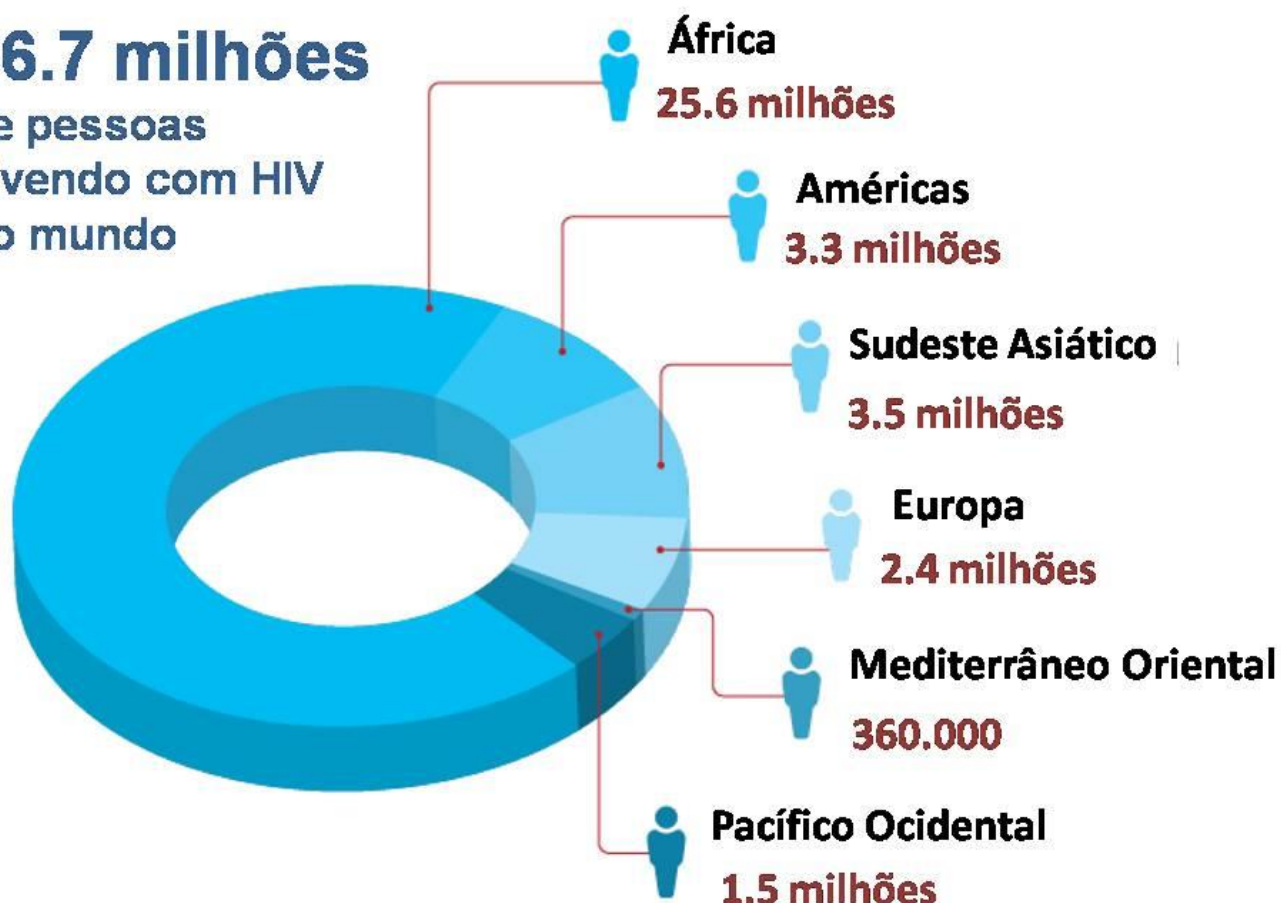


Figura 1.14- Estimativas de 2016 da Organização Mundial da Saúde para o números de pessoas vivendo com HIV no mundo. Figura modificada de WHO 2017.

A transmissão heterossexual é a via mais frequente de transmissão do HIV (SHAW; HUNTER, 2012), sugerindo que a microbiota vaginal pode influenciar este processo. Vários estudos têm encontrado associação entre o risco da infecção por HIV e a presença de vaginose bacteriana e recentes estudos propõem o papel protetor de *L. crispatus* para a infecção (TACHEDJIAN et al., 2007). Adicionalmente, recentes estudos mostram que a concentração fisiológica de ácido láctico é capaz de inativar diferentes subtipos do HIV (ALDUNATE et al., 2013). O *Lactobacillus* é o principal produtor de ácido láctico na microbiota vaginal (TACHEDJIAN et al., 2007). Em contraposição, as bactérias que compõem o cluster IV (*Gardnerella*, *Megasphaera*, *Atopobium* e *Prevotella*), além de promover a ativação e recrutamento de células T-CD4⁺ para a mucosa vaginal, são capazes de reativar a infecção latente por HIV através da produção de ácido butírico (IMAI; OCHIAI, 2013) (Figura 1.15). As células infectadas pelo HIV na forma latente apresentam o genoma

proviral integrado ao genoma do hospedeiro, e o silenciamento da transcrição viral (KUMAR et al., 2015). A hipoacetilação de histonas e a metilação da região LTR viral são dois mecanismos descritos relacionados à latência viral (KUMAR et al., 2015). De forma interessante, o ácido butírico produzido pelas bactérias é capaz de inibir a atividade das deacetilases de histonas (HDAC) diretamente por competir com o substrato da enzima pela ligação no sítio ativo, o que induz a acetilação de histonas e a replicação do HIV, promovendo a ativação do HIV latente (IMAI; OCHIAI, 2013).

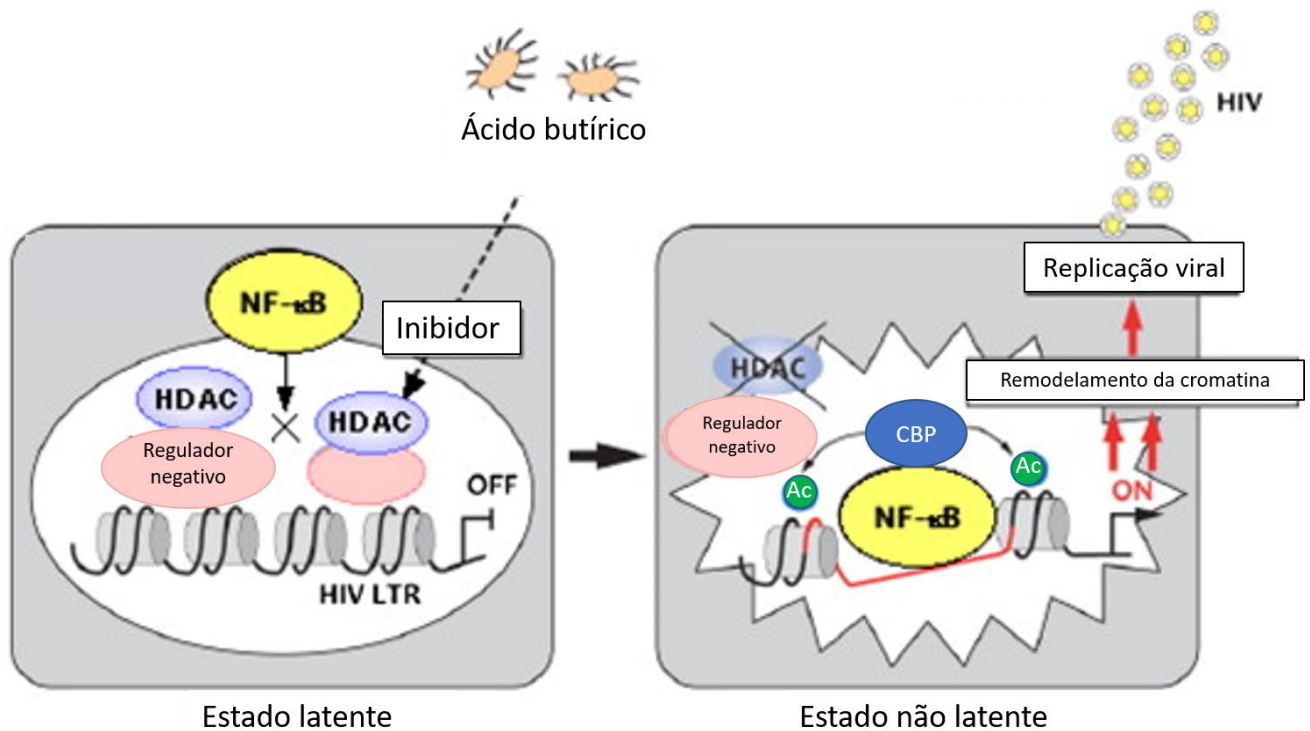


Figura 1.15- Modelo de reativação celular do HIV-1 latente por bactérias produtoras de ácido butírico. Uma série de bactérias anaeróbicas encontradas na vagina produzem altas concentrações de ácido butírico, que atua como um potente inibidor de deacetilases de histonas (HDAC) e induz a remodelação da cromatina, levando à reativação do HIV. O regulador negativo inibe a transcrição através da ativação das proteínas HDAC, que promovem a desacetilação das histonas, inibindo a atividade de NF- κ B. Na presença do ácido butírico, HDACs são inibidas, o que favorece a ativação da transcrição pela ação da proteína CBP (do inglês *CREB binding protein*), que induz a acetilação das histonas. Figura modificada de Imai e Ochiai 2013.

Mulheres HIV-positivas tem um risco aumentado em desenvolver certos tipos de câncer (Tabela 1.1). Os cânceres podem ser divididos em câncer definidores e não-definidores de Aids (MONINI et al., 2004). Os definidores são associados à imunodeficiência causada pelo HIV e se desenvolvem devido à incapacidade do sistema imune de combater infecções causadas por oncovírus, como HPV e EBV

(MONINI et al., 2004). Entretanto, esta população também apresenta um elevado risco no desenvolvimento de cânceres não-definidores de Aids, devido à maior exposição a fatores de risco, como tabagismo, consumo de álcool, e exposição a infecções virais oncogênicas (PINZONE et al., 2012).

Tabela 1.1- Cânceres associados à infecção por HIV

TIPO DE CÂNCER	RISCO RELATIVO	COINFEÇÕES VIRAIS (PREVALÊNCIA DE DNA VIRAL NO TUMOR)
DEFINIDORES DE AIDS		
Sarcoma de Kaposi	258	HHV8 (100%)
Linfoma não-Hodgkin	78,1	EBV, HHV8
Linfoma de Burtkitt	103	EBV (30%)
Colo do útero (invasivo)	8,8	HPV (100%)
NÃO DEFINIDORES DE AIDS		
Pulmão	2,8	?
Fígado	5,1	HBV, HCV
Anal	49,9	HPV
Colo do útero (pré-invasivo)	9,3	HPV

Modificado de Monini et al. 2004.

Estudos têm mostrado uma alta prevalência de infecção pelo HPV em mulheres HIV-positivas, quando comparado com HIV-negativas, apresentando uma chance aumentada de desenvolver lesões cervicais e conseqüentemente o câncer cervical (Adler et al. 2015; De Vuyst et al. 2008; Serraino et al. 1999). Mulheres HIV-negativas comumente eliminam a maioria das infecções por HPV espontaneamente devido à resposta mediada pelas células T-CD4 (AHDIEH et al., 2001; PARAMSOTHY et al., 2009). Entretanto, tanto as mudanças no sistema imune quanto as mudanças nos níveis hormonais podem modular a eliminação das infecções pelo HPV (AHDIEH et al., 2001). De forma interessante, fatores como status hormonal, período menstrual e fatores genéticos podem também alterar a homeostase da microbiota vaginal, promovendo um estado de disbiose (aumento da diversidade bacteriana), o que pode aumentar a chance infecção por HPV, HIV, promover a persistência da infecção por HPV e aumentar o risco para

desenvolvimento do câncer cervical (GAJER et al., 2012; HICKEY et al., 2012; GOSMANN et al., 2017; KYRGIU; MITRA; MOSCICKI, 2017; VITALI; WESSELS; KAUSHIC, 2017). Estudos têm mostrado que durante o período pós-parto existe uma diminuição de 100-1000 vezes dos níveis de estrogênio na circulação (HENDRICK; ALTSHULER; SURI, 1998; MACINTYRE et al., 2015).

1.7 A microbiota vaginal e o período pós-parto

A microbiota cervicovaginal desempenha um papel importante para a saúde da mulher e de sua prole, sendo uma das primeiras comunidades de bactérias a constituir a microbiota intestinal do neonato, com um profundo efeito no seu metabolismo e sistema imune (HOUGHTLING; WALKER, 2015).

Durante a gravidez existe um domínio do gênero *Lactobacillus*. Este gênero desempenha um papel importante inibindo o crescimento de bactérias patogênicas e infecções virais através da secreção de ácido láctico, H_2O_2 e outros metabólicos (TACHEDJIAN et al., 2007). A dominância do gênero *Lactobacillus* está intimamente relacionada à produção de estrogênio (PETROVA et al., 2013; MUHLEISEN; HERBST-KRALOVETZ, 2016) (Figura 1.16). Durante a gestação existe um aumento nos níveis de produção de estrogênio, o que leva ao aumento da produção do glicogênio pelas células epiteliais da mucosa vaginal (SIITERI; MACDONALD, 1966; PETROVA et al., 2013). O glicogênio é utilizado pelo gênero *Lactobacillus*. Durante a gravidez, o aumento da produção do glicogênio é responsável pela estabilidade da microbiota dominante por *Lactobacillus* (MACINTYRE et al., 2015). Após o parto, os níveis de estrogênio caem em até 100-1000x, o que contribui para a perda da estabilidade da microbiota dominante em *Lactobacillus* e contribui para o aumento da diversidade bacteriana durante o período pós-parto (MACINTYRE et al., 2015). A mudança observada na composição durante o período pós-parto ocorre independentemente da etnia (MACINTYRE et al., 2015).

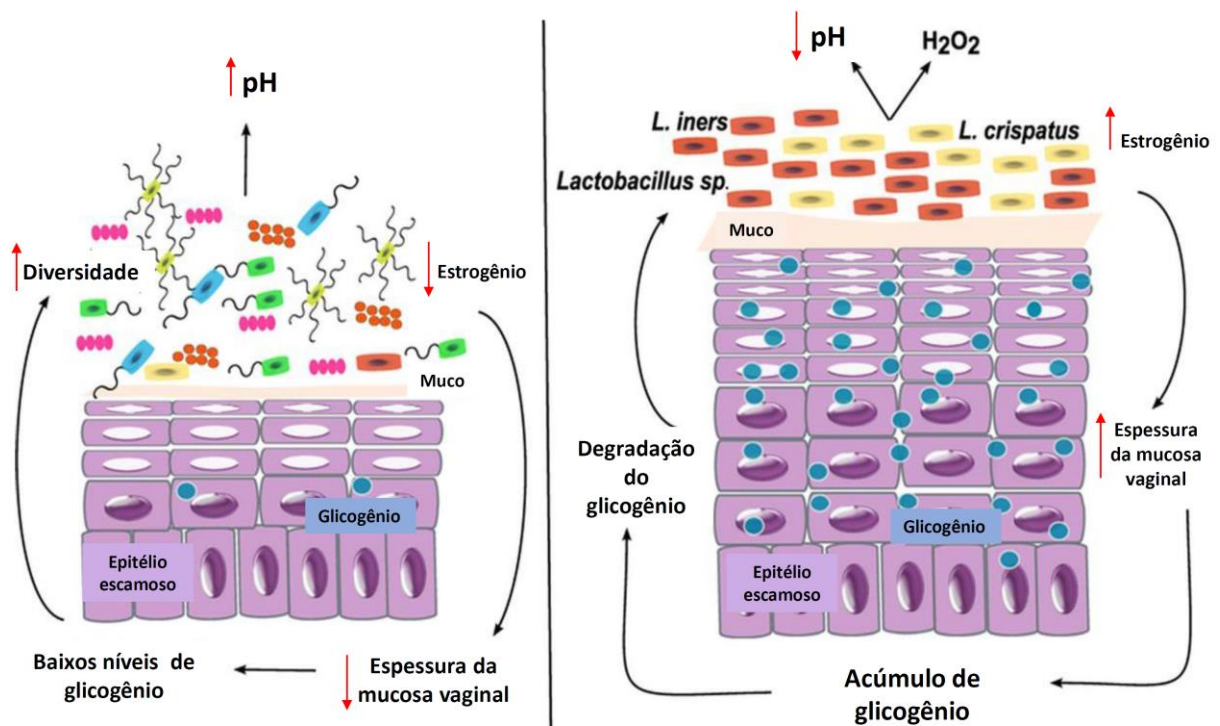


Figura 1.16- Mudanças na mucosa e microbiota vaginal decorrentes da produção de estrogênio. Os níveis baixos de estrogênio resultam em mucosas finas e baixos níveis de glicogênio, que estimulam o crescimento de diversas espécies microbianas. Os níveis de glicogênio aumentam, devido ao aumento dos níveis de estrogênio. A degradação de glicogênio em glicose seleciona microorganismos fermentadores de glicose tais como *Lactobacillus*, Estes reduzem o pH vaginal e previnem o crescimento de bactérias patogênicas. Figura modificada de Petrova et al. 2013.

Estudos relatam que 10 a 70% dos casos de displasia diagnosticados durante a gravidez regredem ou até mesmo desaparecem no período pós-parto (FREGA et al., 2007). A neoplasia cervical é relatada em 25-47% dos casos e a progressão em 3-30% dos casos (FREGA et al., 2007). Adicionalmente, estudos mostram um aumento da eliminação do HPV no período pós-parto; cerca de 70-90% das mulheres eliminam a infecção por HPV neste período (JALIL et al., 2013). Entretanto, uma pequena parte das mulheres (cerca de 10-30%) não eliminam a infecção, podendo desenvolver lesões cervicais.

Pouco é conhecido sobre a microbiota cervical presente no período pós-parto em mulheres HIV-positivas com lesão cervical. Sendo assim, neste trabalho foi avaliado o perfil da microbiota vaginal no período pós-parto de mulheres HIV-positivas com lesão e sem lesão intraepitelial cervical. Nossa hipótese é a de que mulheres HIV-positivas com lesão cervical no período pós-parto apresentam uma microbiota distinta quando comparadas àquela de mulheres com citologia normal.

2 Objetivos

2.1 *Objetivo principal:*

Neste estudo analisamos a diversidade da microbiota cervicovaginal de mulheres HIV-positivas no período pós-parto, a fim de detectar possíveis biomarcadores que poderiam estar associados ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais cervicais. Neste contexto, o objetivo principal do trabalho foi avaliar o perfil da microbiota cervical no período pós-parto de mulheres HIV-positivas com e sem lesões intraepiteliais cervicais.

2.2 *Objetivos secundários:*

- Determinar os grupos de comunidades bacterianas (CSTs) presentes nas amostras;
- Avaliar a associação das CSTs com o período pós-parto, o status HPV e com lesão cervical;
- Avaliar a associação dos tipos de HPV (16 e não-16) com as CSTs;
- Avaliar a associação de outros vírus circulares com as CSTs;
- Analisar o perfil de bactérias em mulheres com e sem lesão cervical e determinar possíveis biomarcadores bacterianos para lesões.

3 Material e Métodos

3.1 Amostras coletadas

Oitenta mulheres em acompanhamento clínico do programa para grávidas HIV-positivas do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) participaram deste estudo. A infecção por HIV foi confirmada sorologicamente pelo teste rápido de HIV ou pelo teste de ELISA e subsequentemente por Western blot de acordo com a diretrizes para o diagnóstico de HIV do Ministério da Saúde.

O acompanhamento clínico das pacientes foi realizado no período de 2009 a 2011. O esfregaço cervical foi realizado durante o acompanhamento clínico. Utilizou-se neste estudo as coletas realizadas no período pós-parto, seis e 12 meses após o parto. Todas as pacientes estavam, no momento do estudo, sobre tratamento antirretroviral. As informações de citologia foram obtidas pelo exame ginecológico e foram classificadas de acordo com o sistema de Bethesda 2001 (SOLOMON et al., 2002).

Para o estudo de perfis de CSTs da casuística estudada, somente uma amostra temporal de cada paciente foi utilizada. Assim, das oitenta mulheres arroladas no estudo, 26 foram analisadas no período pós-parto de 6 meses e 54 no período pós-parto de 12 meses. Na análise longitudinal, 25 destas mulheres tiveram ambos os pontos de coleta (6 e 12 meses) analisados, totalizando 50 amostras pareadas. Utilizou-se como critério de seleção das mulheres para análise longitudinal a informação citológica dos dois pontos de coleta. Mulheres que apresentavam informação citológica em apenas um dos pontos foram excluídas da análise longitudinal, assim como mulheres que apresentavam citologia ASCUS/ASGUS em um dos pontos. Incluindo as duas análises propostas, um total de 105 amostras foram analisadas neste estudo (Figura 3.17).

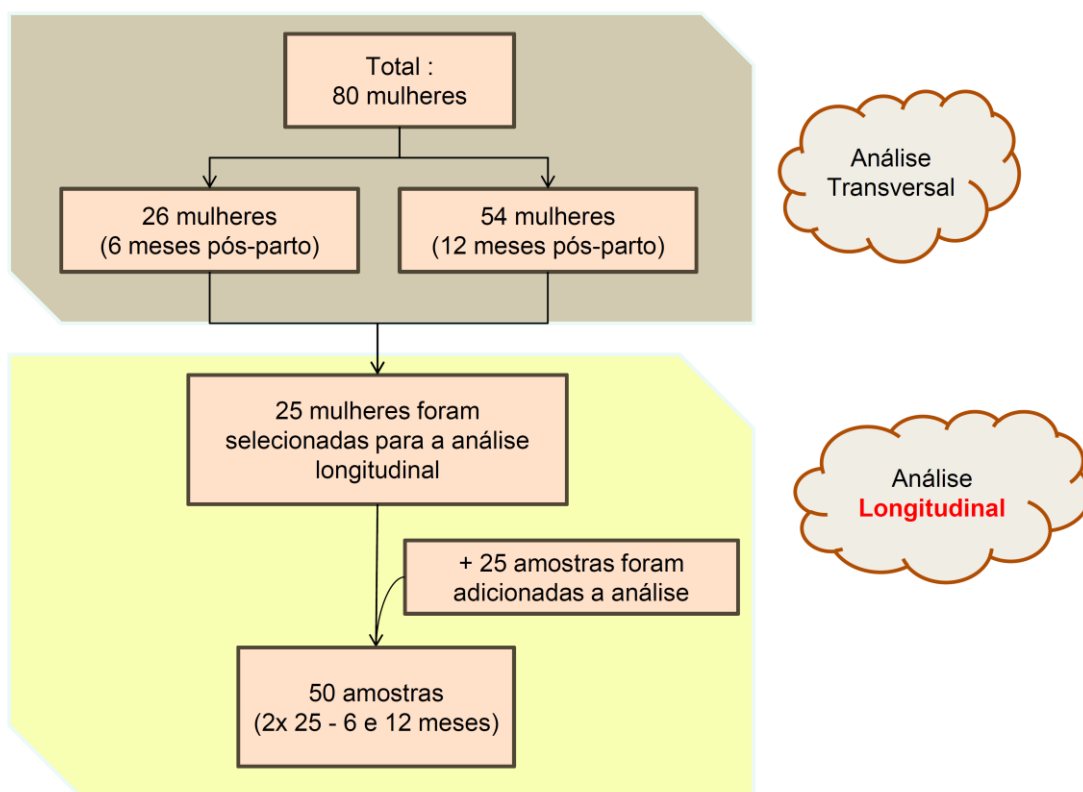


Figura 3.17- Esquema do fluxo das amostras utilizadas neste estudo.

As informações clínicas, obstétricas e sócio-demográficas foram obtidas dos registros médicos e de um questionário respondido pelas participantes. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da UFRJ (protocolos 029/08 para o Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e 18/10 para o IPPMG) e do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (protocolo 142/10). Todas as participantes leram e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da realização do estudo. Todos os procedimentos experimentais envolvendo a coleta das amostras foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentações do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Brasil.

3.2 Extração de DNA e tipagem do HPV

O DNA genômico foi extraído dos esfregaços cervicais com o kit RBC Genomic DNA Extraction (Realbiotech, Taiwan), de acordo com o protocolo de fabricante, e estocado a -20°C .

O HPV foi detectado pela PCR realizada em duas etapas (aninhada) de um fragmento do gene *L1* usando os iniciadores MY09/MY11 e GP5/GP6 e as condições de PCR conforme descritos por Siqueira (2016). O produto da segunda reação de PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com

banda de aproximadamente 150pb. As amostras positivas para HPV foram purificadas utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, EUA) e sequenciadas por Sanger. As sequências obtidas pelo sequenciamento foram editadas e o tipo de HPV foi identificado por BLAST (Siqueira, 2016).

3.3 Amplificação e análise do rRNA 16S bacteriano

A região V3-V6 do gene ribossomal 16S bacteriano foi amplificada usando os iniciadores universais 338F e 1061R, descritos em estudo prévio como sendo capazes de amplificar mais de 90% das sequências de 16S anotadas no banco de dados Greengenes (ONG et al., 2013).

A reação de PCR da região V3-V6 foi realizada utilizando 5 µl do tampão da enzima Taq Platinum 10X, 1,5µl de MgCl₂ (a 50mM), 0,4µl do mix de dNTP (a 25mM), 1µl de cada iniciador (a 25 pmol/µl) e 0,25 µl de Taq Platinum polimerase (a 5U/µl). O volume final da reação foi ajustado para 50 µl usando água livre de RNase e DNase (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A ciclagem foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação (95°C, 30s), anelamento (59°C, 30s) e extensão (72°C, 1 minuto), e um ciclo final de alongação (72°C, 10 minutos). O produto da PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e amostras que apresentaram bandas nos tamanhos de 700 e 1000 pb foram purificadas usando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*. A variação do tamanho das bandas ocorre devido à variação do tamanho das regiões variáveis do gene 16S nas diferentes espécies de bactérias.

O produto purificado foi quantificado no NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), e 0,4 ng de DNA foi usado no kit *Nextera XT DNA Sample Preparation* (Illumina Inc., San Diego, EUA) para preparar as bibliotecas para o sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq 2500. As bibliotecas foram quantificadas por qPCR com o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems, Wilmington, EUA) e diluídas para concentração final de 10 pM. As bibliotecas diluídas foram adicionadas a uma *flow cell*. A *flow cell* é uma lâmina que apresenta oligonucleotídeos em sua superfície que são complementares às sequências adaptadoras adicionadas ao DNA durante a confecção das bibliotecas. Após a adição das bibliotecas à *flow cell*, é realizada a *clusterização*. A clusterização foi realizada no cBot (Illumina) para a realização da amplificação clonal das sequências

das bibliotecas na *flow cell*. Após a *clusterização*, o sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma Illumina® HiSeq 2500 (Illumina).

Ao final do sequenciamento, as sequências (*reads*) em formato BCL foram convertidas para FASTQ usando o software *BCL2FastQ*v.2.18 (Illumina), os *reads* de cada amostra foram identificados utilizando os *barcodes* utilizados e, por último, as sequências dos *barcodes* foram retiradas. A análise de qualidade dos *reads* foi realizada usando o programa FastQC (Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK) e os *reads* foram filtrados por tamanho (100pb) e qualidade (>20) usando o script *split_libraries_fastq.py* do QIIME (do inglês *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPORASO et al., 2010). Após a filtragem dos *reads*, as OTUs (do inglês *operational taxonomic units*) foram definidas usando o script *pick_closed_reference_otus.py* do QIIME e utilizando o banco de dados Greengenes. As OTUs são *clusters* de sequências com similaridade, geralmente, de 97%. Estes *clusters* são utilizados para definição da abundância e *taxa* das bactérias. Na etapa da anotação do táxon, uma única sequência do *cluster* é comparada com o banco de dados de 16S e o táxon é definido. Este processo otimiza o tempo das análises e geralmente não requer um computador de alta performance.

Apenas as OTUs que foram assinadas com a referência (banco de dados Greengenes) foram analisadas neste estudo. OTUs que apresentaram abundância menor que 0,005% em todas as amostras foram descartadas, e as OTUs remanescentes foram definidas nos níveis de filo, classe, ordem, gênero e espécie.

Para definição dos grupos de comunidades bacterianas, utilizou-se a *clusterização* não-supervisionada baseada nas métricas de dissimilaridade Bray-Curtis. Utilizou-se o Bray-Curtis para definir os *clusters* das amostras de acordo com a abundância e diversidade dos táxons presentes. Os *clusters* foram definidos de acordo com a classificação da literatura, onde são denominados de CSTs (GAJER et al., 2012; BROTMAN et al., 2014; FORNEY; RAVEL, 2014). As CSTs são classificadas em CST I, II, III, IV e V, de acordo com os tipos de bactéria dominante. A diversidade de cada CST foi estimada usando o índice de Shannon e a métrica de diversidade filogenética (*Phylogenetic Diversity* - PD). Todos os gráficos e análises foram conduzidos usando o ambiente R.

3.4 Amplificação de DNA viral circular e identificação dos vírus

O viroma e bacterioma de 22 amostras foram analisados para as amostras

que apresentaram informações tanto das CSTs definidas neste estudo quanto a informação dos viomas definidos em um estudo prévio do grupo (SIQUEIRA, 2017). Para a caracterização do vioma foi realizado o enriquecimento do DNA circular pela amplificação do círculo rolante (RCA – do inglês *Rolling Circle Amplification*) utilizando o kit *TempliPhi Amplification* (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. O DNA enriquecido foi analisado em gel de agarose a 0,8% em tampão NaOH 1X, e as amostras que apresentaram bandas de alto peso molecular foram purificadas por precipitação usando o protocolo de etanol/Isopropanol (SIQUEIRA, 2017). Após a purificação o produto foi ressuspensionado em 20µl de H₂O ultrapura e armazenado a -20°C. O DNA enriquecido purificado foi quantificado em plataforma NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), e 0,4 ng de DNA foi usado no kit *Nextera XT DNA Sample Preparation* (Illumina) para preparar as bibliotecas para o sequenciamento no Illumina, plataforma HiSeq 2500. As bibliotecas foram quantificadas por qPCR com o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems) e diluídas para concentração final de 10 pM. As bibliotecas diluídas foram clusterizadas, e o sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma Illumina® HiSeq 2500, conforme descrito previamente.

No final do sequenciamento os *reads* em formato BCL foram convertidas para FASTQ usando o BCL2FastQ2 software (versão 2.18, Illumina Inc.) e a sequência dos barcodes foram retiradas. A análise de qualidade dos *reads* foi realizada usando o programa *FastQC* (Babraham Bioinformatics) e os *reads* foram filtrados por tamanho (100pb) e qualidade (>20) no programa *Sickle* (JOSHI; FASS, 2011).

A etapa da definição das famílias virais foi realizada com a utilização de um pipeline *in house* (SIQUEIRA, 2017), para a montagem de *contigs* e identificação viral por similaridade. Este pipeline apresenta etapas de filtragem de sequências não-virais, de remoção de *reads* duplicados, montagem *de novo* e, por fim, de identificação viral por similaridade. Os programas utilizados no pipeline foram o Bowtie 2 (Langmead eSalzberg 2012), *Ensemble Assembler*.v.1.0 (DENG et al., 2015) e BLASTX (CAMACHO et al., 2009). O Bowtie 2 é utilizado para alinhar os *reads* filtrados contra o banco de dados de bactérias e contra o genoma humano, removendo posteriormente os *reads* que apresentam similaridade. Em seguida, os *reads* idênticos foram removidos e foi mantida apenas uma cópia de cada sequência, que é submetida à montagem *de novo* utilizando o *Ensemble Assembler* v.1.0. Os *contigs* gerados, assim como os *reads*, foram comparados através do programa

BLASTX com o banco de dados de proteínas virais do RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). As sequências que apresentaram resultado com *e-value* (do inglês *expect value*) menor que 0,01 foram comparadas com o programa BLASTX a um banco de dados de proteínas não-virais extraído do RefSeq. Por fim, os *reads* que mantiveram a classificação no BLASTX para vírus foram considerados na análise e classificados aos níveis de família e gênero.

A quantidade de *reads* atribuídos a cada gênero viral das famílias foi normalizada através do cálculo do log10 de 1 mais a divisão do número de *reads* atribuídos a cada gênero ou família viral dividido pelo total de sequências submetidas ao programa BLASTX multiplicado por um milhão ($\log_{10} (1 + (\textit{reads} \textit{ atribuídos a família ou gênero viral} / \textit{total de reads submetidos ao BLASTX} * 1.000.000))$), como descrito em um trabalho prévio do grupo (SIQUEIRA, 2017).

3.5 Análises estatísticas

A frequência da citologia cervical (normal e lesão) e status HPV foram comparadas entre os dois pontos de coleta do estudo (seis e 12 meses pós-parto) usando o teste qui-quadrado de Pearson no software SPSS (IBM Corporation, Chicago, EUA). O teste qui-quadrado de Pearson também foi utilizado para comparar a distribuição das frequências das CSTs com a citologia cervical (normal X lesão), status HPV (positivo X negativo) e entre os pontos de coleta (seis X 12 meses). A diversidade das CSTs (índices de Shannon e PD) foi comparada entre os tipos de CSTs utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney no SPSS. A frequência das CSTs e o tipo de HPV (16 e não-16) foram comparados usando o teste McNemar no SPSS. As porcentagens de *reads* das famílias virais (Herpesviridae, Genomoviridae e Anelloviridae) nas CSTs foram comparadas usando o teste Wilcoxon no SPSS. Adicionalmente, o teste McNemar foi realizado para comparar a distribuição das CSTs e a frequência das famílias virais (<1% e >1%) no SPSS. O scatter plot para CSTs e famílias virais foi construído usando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

O LEfSe (do inglês *Linear Discriminative Analysis (LDA) Effect Size*) foi usado no ambiente Galaxy para a identificação das bactérias com diferença significativa de abundância relativa entre a citologia normal e a lesão, indicando possível biomarcador. A ferramenta usa o teste Kruskal-Wallis e estima o tamanho do efeito através da métrica LDA; foi utilizado um intervalo de confiança de 99% nesta análise.

Entretanto, apesar de amplamente utilizado, o LEfSe não realiza correção para múltiplas comparações, podendo existir falsos-positivos entre os valores de p significativos. A correção do p -valor dado pelo LEfSe foi realizada no ambiente *R*.

A razão de chance (do inglês *odds ratio*, OR) para presença de táxons associados a lesão foi calculada usando o Microsoft Excel para Windows. O p -valor foi estimado de acordo com Sheskin (2004). As análises longitudinais foram conduzidas em amostras pareadas que mantiveram (lesão/lesão, normal/normal) ou mudaram (lesão/normal, normal/lesão) o status citológico. Diferenças significativas na abundância relativa dos táxons nas amostras pareadas foram calculadas usando o teste de Wilcoxon no SPSS.

4 Resultados

4.1 Características sócio-demográficas e clínicas da casuística

Para a descrição sócio-demográficas das participantes do estudo, as frequências e medianas das variáveis categóricas e quantitativas foram calculadas. A mediana de idade das participantes foi de 28 anos. Aproximadamente 60% das mulheres nunca fumaram. A mediana de idade da primeira relação sexual foi de 15 anos, 70% das mulheres tiveram mais de três parceiros até a data da coleta e 48% das mulheres usavam contraceptivo hormonal antes da gravidez (Table 4.2).

Tabela 5.2- Informações sócio-demográficas das pacientes do estudo

Mediana Idade (min-máx)	28 (17-44)
Fumo (% ,N/Total)	
Fuma atualmente	15 (12/80)
Fumou no passado	26 (21/80)
Nunca fumou	58 (46/80)
N/A*	1 (1/80)
Mediana da idade da 1ª relação sexual (min-máx)	15 (9-25)
Número de parceiros (% ,N/Total)	
1 a 3 parceiros	30 (24/80)
>3 parceiros	70 (56/80)
Método contraceptivo (% ,N/Total)	
Hormonal	48 (38/80)
Preservativo	33 (27/80)
Outros	2 (2/80)
Nenhum	16 (13/80)
Estado civil (% , N/Total)	
Solteira	31 (25/80)
União estável	56 (45/80)
Casada	11 (9/80)
Divorciada	1 (1/80)
Mediana da idade da menarca (min-máx)	12 (9-16)
Nível de instrução (% ,N/Total)	
Analfabeta	1 (1/80)
1º grau incompleto	11 (9/80)
1º grau completo	44 (35/80)
2º grau incompleto	13 (10/80)
2º grau completo	26 (10/80)
3º grau incompleto	0 (0/80)
3º grau completo	5 (4/80)

* Informação não disponível

As medianas da contagem de células T CD4⁺ e carga viral do HIV foram de 579 células/ μ l e 344 cópias/ml no período de seis meses pós-parto e de 548 células/ μ l e 409 cópias/ml em 12 meses pós-parto, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os períodos.

A frequência de mulheres HPV-negativas foi significativamente maior em 12 meses do que em seis meses (8% *versus* 37%) (Tabela 4.3). Entretanto, a frequência de mulheres HPV-positivas com lesão (LSIL/HSIL) foi maior em 12 meses pós-parto.

Tabela 4.3- Frequência do status de HPV e da citologia cervical no período de seis e 12 meses pós-parto

		6 meses % (n=26)	12 meses % (n=54)	p-valor*
Citologia cervical	Normal	65 (17/26)	46 (25/54)	0.109
	Lesão	35 (9/26)	54 (29/54)	
HPV	Positivo	92 (24/26)	63 (34/54)	0.006
	Negativo	8 (2/26)	37 (20/54)	
Citologia/ HPV positiva	Normal	58 (15/26)	15 (8/54)	0.003
	Lesão	38 (9/26)	48 (26/54)	
Citologia- HPV negativo	Normal	8 (2/26)	31 (17/54)	0.556
	Lesão	0 (0/26)	6 (3/54)	

*Teste de *qui-quadrado de Pearson*.

4.2 Microbioma e diversidade

A definição dos *clusters* ou grupos de comunidades bacterianas foi realizada através da *clusterização* não-supervisionada das amostras. Quatro CSTs foram definidas de acordo com a literatura e partir de nossos próprios dados, CST III e CST IV (IV-A, IV-B.1 e IV-B.2) (Figura 4.18). A classificação das CSTs se dá pelo perfil ou espécie de bactéria dominante no *cluster*. As CSTs I, II, III e V apresentam predominância de espécies de *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. Iners* e *L. jensenii*, respectivamente) e a CST IV apresenta alta diversidade de bactérias, com alta abundância de bactérias anaeróbicas. A CST IV pode ser subdividida, como mostrado nos resultados, em dois tipos, denominados de CST IV-A, CST IV-B (1 e 2) de acordo com seu perfil de bactérias (GAJER et al., 2012; BROTMAN et al., 2014; FORNEY; RAVEL, 2014) (Figura17). A CST IV-A apresenta alta diversidade bactérias e baixa proporção das espécies de *Lactobacillus*. Adicionalmente, neste estudo descreve uma subdivisão do *cluster* da CST IV-B. Os clusters com predominância dos gêneros *Gardnerella* e *Prevotella* foram distinguíveis pelo método de *clusterização* e denominados de CST IV-B.1 e CST IV-B.2, respectivamente. (Figura 4.18).

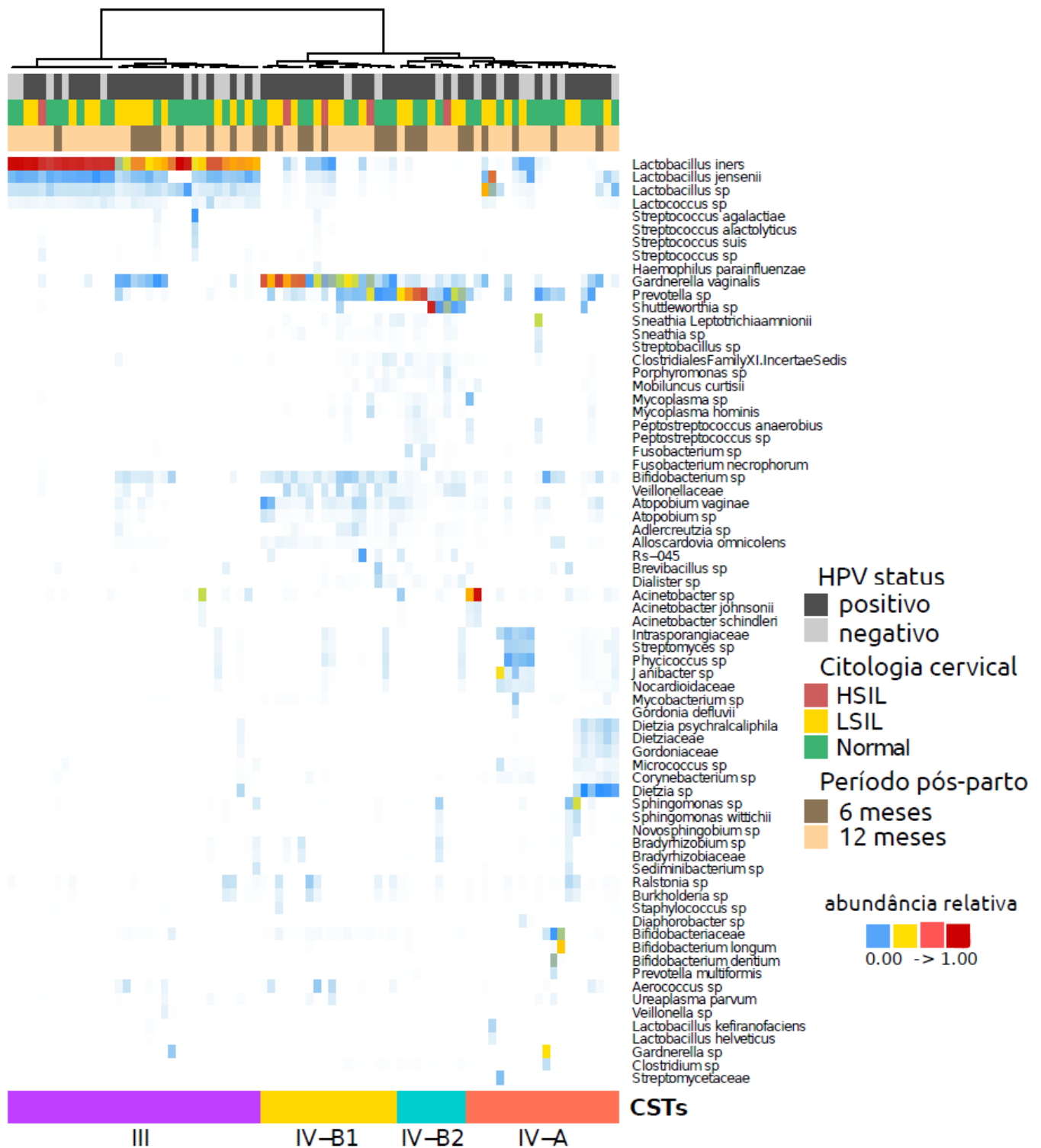


Figura 4.18 - Heatmap gerado pela *clusterização* hierárquica não-supervisionada dos *taxa* definidos. As CSTs foram definidas com base na métrica de dissimilaridade Bray-Curtis e são mostradas na barra inferior da figura, assim como também pelo dendrograma no topo da figura. O status de HPV, a citologia cervical e o período pós-parto estão representados por cores de acordo com a legenda à direita da figura. A CST III é *Lactobacillus iners*-dominante; CST IV-A tem uma baixa proporção de *Lactobacillus* e uma alta diversidade; CST IV-B.1 é *Gardnerellavaginalis*-dominante e CST IV-B.2 é *Prevotella*-dominante. Todos os *taxa* mostrados no gráfico apresentaram abundância relativa $\geq 1\%$.

A fim de avaliar o valor da diversidade das CSTs encontradas, o índice de Shannon e a diversidade filogenética (PD) foram calculadas. Ambos os testes calculam a diversidade, porém usando diferentes métricas. O índice de Shannon leva em consideração o número de espécies observadas e atribui pesos iguais entre as espécies raras e abundantes. Já o PD calcula a diversidade com base nas distâncias entre os ramos da árvore filogenética dos táxons definidos.

Os valores dos índices de Shannon e PD apresentaram uma diversidade significativamente menor no CST III quando comparado ao CST IV (IV-A, IV-B.1, IV-B.2). A análise de PD também demonstrou uma diferença significativa entre os *clusters* CST IV-B.2 e CST IV-A (Figura 4.19).

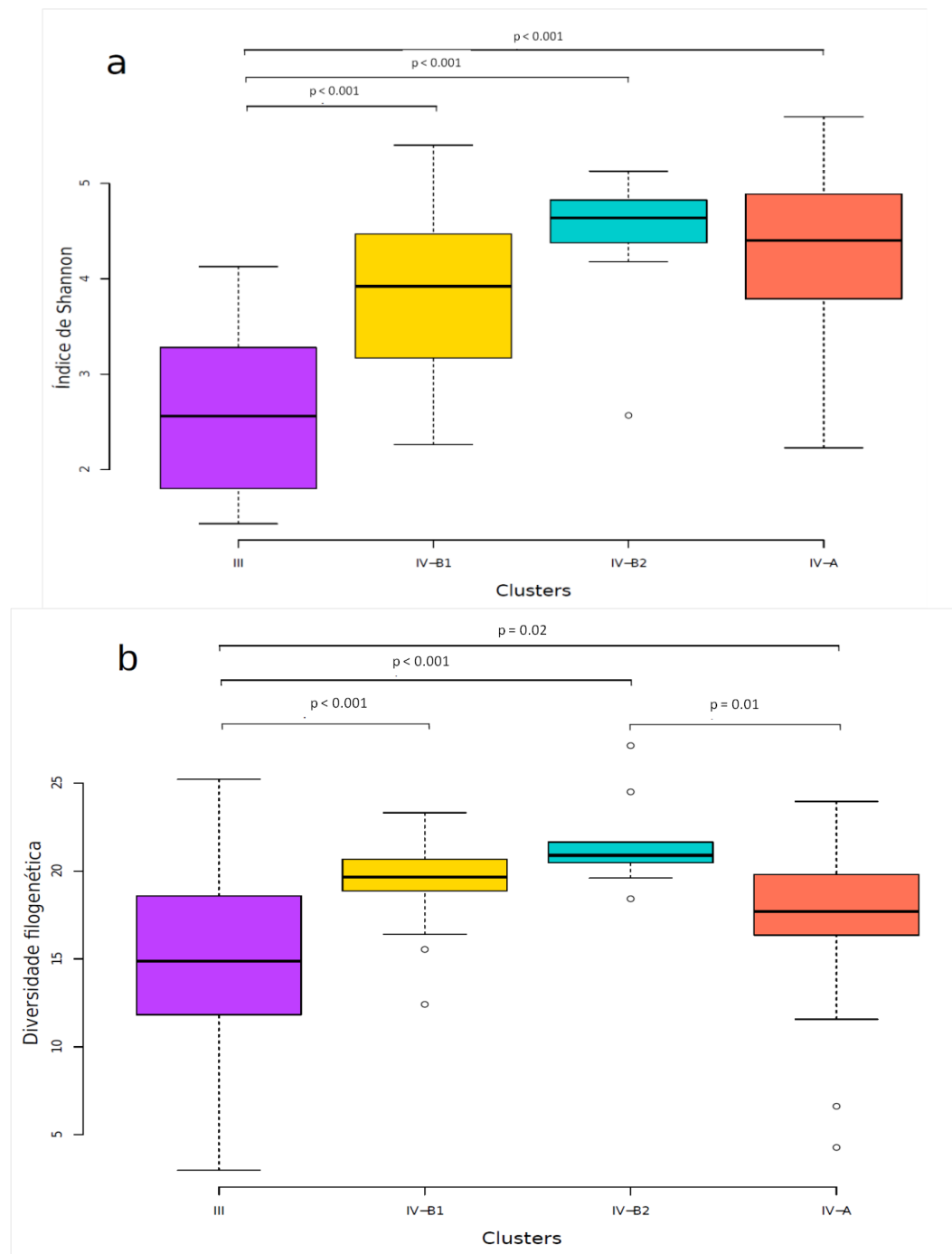


Figura 4.19–Box plot da análise da diversidade das CSTs usando(a) o índice de Shannon e (b) a diversidade filogenética. As análises em (a) e (b) foram realizadas para cada CST definida. O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparar a diversidades entre cada CST e os valores de p significativos, inferiores a 0,05, são representados nas linhas horizontais acima dos gráficos.

Estes resultados demonstram que a população de estudo apresenta uma alta frequência da microbiota de alta diversidade (CST IV), não sendo detectada nesta população a presença das CSTs I, II e V que apresentam espécies de *Lactobacillus*

dominante, com exceção da CST III (*L. iners*-dominante).

A distribuição das CSTs III e IV (IV-A, IV-B.1, IV-B.2) das amostras foi analisada para o período pós-parto (6 x 12 meses), status de HPV (positivo x negativo) e status citológico (normal x lesão) (Tabela 4.4). Contudo, não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das comparações, o que sugere que a microbiota no período pós-parto é estável, não sofrendo variações dentro das variáveis analisadas.

Tabela 4.4- Frequência da distribuição das CSTs (III e IV) para citologia cervical, status de HPV e período pós-parto

		CST III % (N/Total)	CST IV % (N/Total)	p-valor*
Pós-parto	6 meses	27 (9/33)	36 (17/47)	0.403
	12 meses	73 (24/33)	64 (30/47)	
Citologia cervical	Normal	54 (24/33)	51 (24/47)	0.759
	Lesão	46 (15/33)	49 (23/47)	
HPV	Negativo	33 (11/33)	23 (11/47)	0.328
	Positivo	67 (22/33)	77 (36/47)	

* Teste de qui-quadrado de Pearson.

4.3 Viroma e bacterioma

Adicionalmente, as frequências das CSTs (III e IV) para os tipos de HPV (16 e não-16) e para as famílias virais identificadas pela metodologia de RCA em um estudo prévio do grupo (SIQUEIRA, 2017) foram analisadas. Foram identificadas quatro famílias virais pela metodologia, Papillomaviridae, Anelloviridae, Genomoviridae e Herpesviridae.

A família Papillomaviridae foi analisada quanto ao tipo de HPV presente (16 e não-16) e a sua distribuição dentro das CSTs III e IV (Figura 4.20). A distribuição do tipo de HPV não-16 foi significativamente maior nas amostras que apresentaram CST IV.

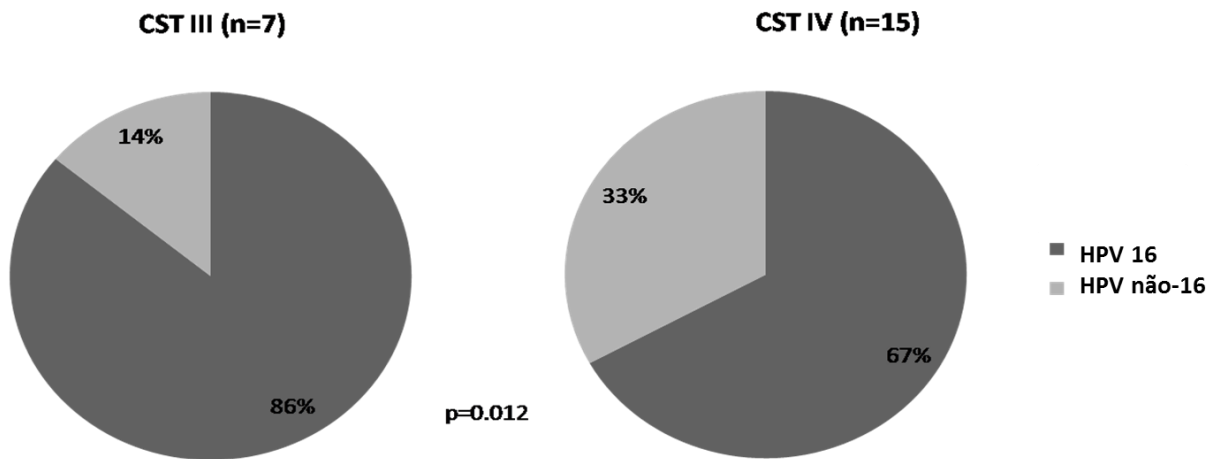


Figura 4.20 – Distribuição dos genótipos de HPV (16 e não-16) nas CSTs (III e IV). Os gráficos em pizza mostram a distribuição dos tipos de HPV (16 e não-16) nas amostras que apresentam CSTs III e IV. O p-valor foi calculado usando o teste McNemar.

As abundâncias das outras famílias virais encontradas nas amostras (Anelloviridae, Genomoviridae e Herpesviridae) para o tipo de CST (III e IV) correspondentes foi analisada. Realizou-se a análise utilizando um valor de corte de 1% na abundância das famílias virais (Figura 4.21). A abundância superior a 1% foi significativamente associado à CST IV para as três famílias virais, Anelloviridae, Genomoviridae e Herpesviridae. Estes dados sugerem a associação dos tipos de CSTs com a infecção das diferentes famílias virais.

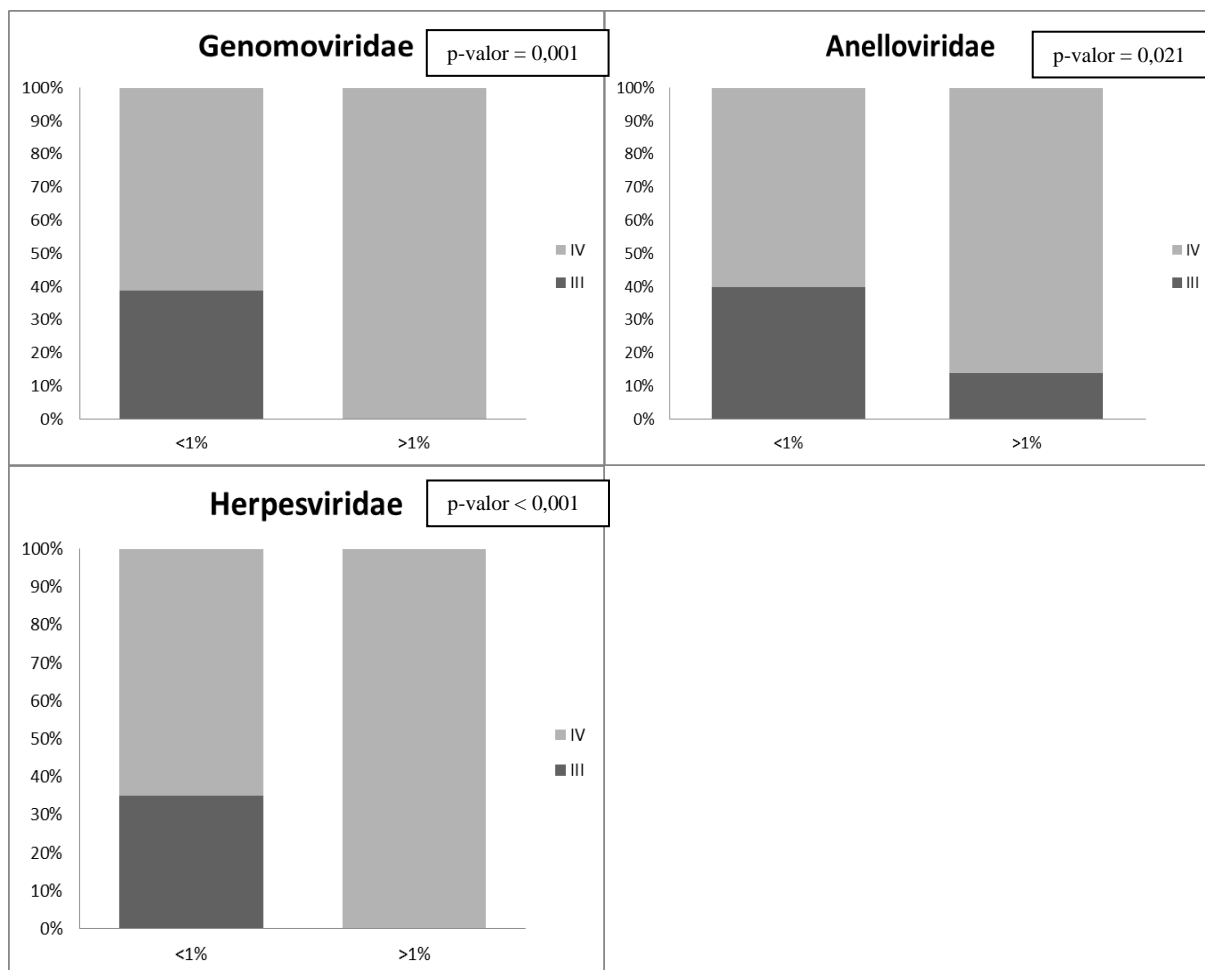


Figura 4.21- Análises de associação das CSTs (III e IV) com a infecção por famílias virais de DNA circular. O valor de corte da abundância das famílias virais de 1% (>1 e <1) é mostrado no eixo x dos gráficos. Os valores de p foram obtidos pelo teste McNemar.

4.4 Análise de biomarcadores de lesão

Os diferentes táxons identificados com o *pipeline* do QIIME foram comparados para o status citológico (normal x lesão) usando a análise de LEfSe. A análise demonstrou cinco táxons associados com lesões (*Gardnerella vaginalis*, *Aerococcus*, *Schlegelella thermodepolymerans*, *Moryella* e *Bifidobacterium bifidum*), todos com alta abundância em lesões quando comparados com a de citologia normal (Figura 4.22). Porém, quando realizou-se as correções para múltiplas comparações, apenas *Moryella* permaneceu significativa (q -valor= 0.036) (Figura 4.22c). Entretanto, devido ao fato da análise de LEfSe sugerir associações significativas, decidimos manter todas as cinco bactérias nas análises seguintes a fim de avaliar a potencial associação dos táxons com lesões cervicais.

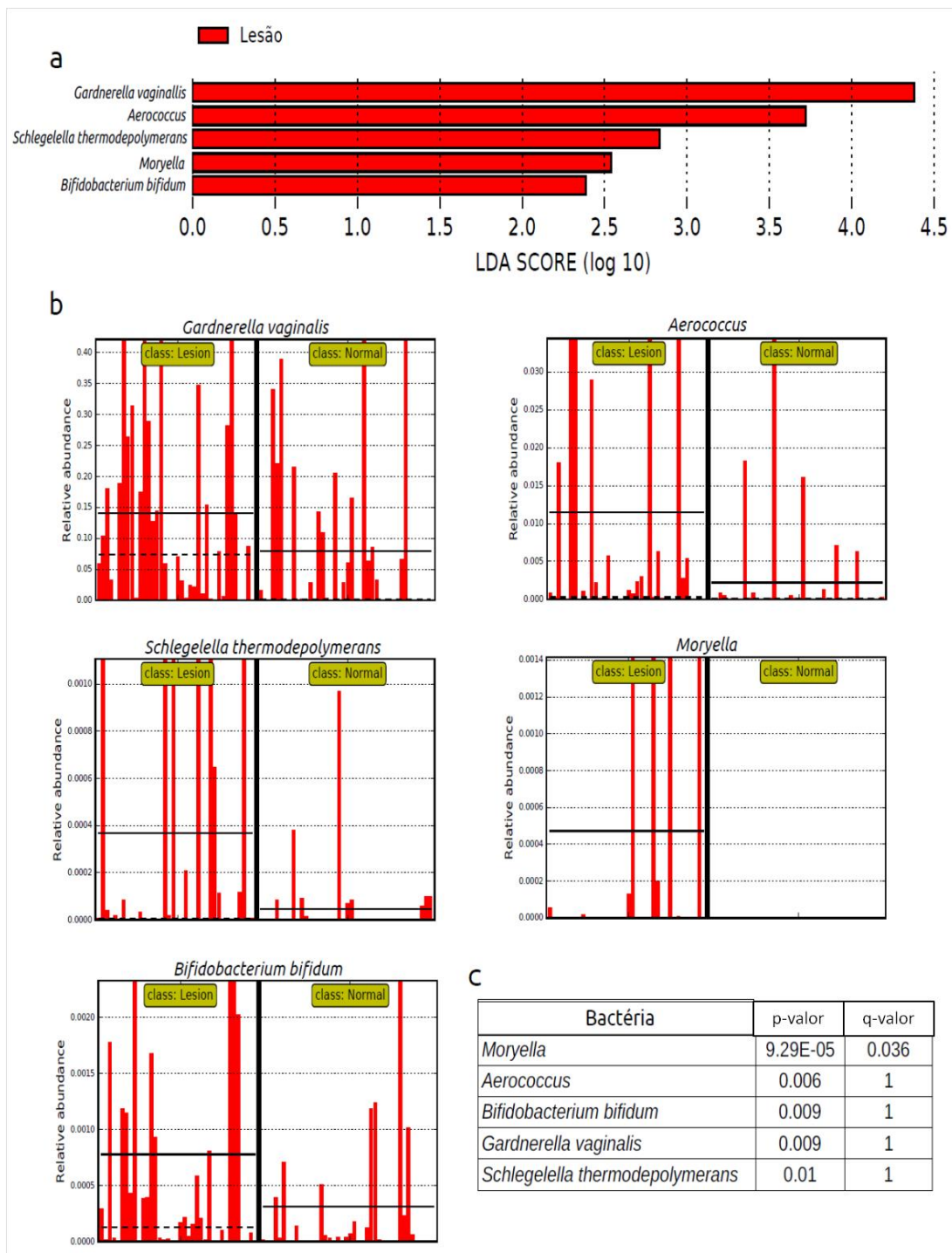


Figura 4.22- Análise de possíveis biomarcadores de lesão cervical indicados pelo LEfSe. (a) Histograma do valor do LDA (log 10) mostrando bactérias que apresentaram maior abundância relativa em lesões cervicais (vermelho) quando comparadas a citologias normais. Somente diferenças estatisticamente significativas são mostradas. (b) Histogramas mostrando a abundância relativa em citologia normal e lesão dos cinco *taxa*. As linhas pretas sólidas e pontilhadas nos gráficos indicam os valores de abundância relativa média e mediana para cada grupo, respectivamente. (c) Os valores de p obtidos pela análise de LEfSe e os valores de p corrigidos para comparações múltiplas (q-valores) são mostrados.

As razões de chance (OR) foram calculadas para estimar o risco da presença

destas bactérias em lesões. *Schlegelella thermodepolymerans* e *Moryella* apresentaram significativa razão de chance, de 3,5 (1,4–8,9) e 40,1 (2,28–706), respectivamente, para lesões (Tabela 4.5). O teste de qui-quadrado confirmou a associação.

Tabela 4.5- Razões de chance (OR) para a ocorrência de bactérias específicas em lesões cervicais

Bactéria	Normal% (N/Total)	Lesão% (N/Total)	p-valor ¹	q-valor ²	OR (IC95%) ³	p-valor ⁴
<i>Gardnerella vaginalis</i>						
Presença	46 (37/80)	48 (38/80)	0.028	0.14	11.3 (0.6-211.46)	0.10
Ausência	6 (5/80)	0 (0/80)				
<i>Bifidobacterium bifidum</i>						
Presença	35 (28/80)	39 (31/80)	0.13	0.65	2.2 (0.8-6.3)	0.13
Ausência	18 (14/80)	9 (7/80)				
<i>Moryella</i>						
Presença	0 (0/80)	15 (12/80)	< 0.01	< 0.01	40.1 (2.3-705.8)	0.01
Ausência	53 (42/80)	33 (26/80)				
<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>						
Presença	14 (11/80)	26 (21/80)	0.01	0.04	3.5 (1.4-8.9)	0.01
Ausência	39 (31/80)	21 (17/80)				
<i>Aerococcus</i>						
Presença	50 (40/80)	48 (38/80)	0.17	0.85	4.8 (0.2-102.2)	0.32
Ausência	3 (2/80)	0 (0/80)				

¹Teste de *qui-quadrado de Pearson*.

²Teste de *qui-quadrado de Pearson* após correção de Bonferroni.

³OR foi calculado de acordo com a modificação de Haldane, que adiciona 0.5 para todas as células quando um dos valores é zero.

⁴Calculado de acordo com Sheskin, 2004.

Adicionalmente, os táxons significativos na análise de LefSe foram analisados longitudinalmente em amostras pareadas coletadas em seis e 12 meses pós-parto. Um total de 25 mulheres foram analisadas, sendo 16 amostras que mantiveram a citologia (normal ou lesão), cinco amostras que regrediram (lesão para normal) e quatro amostras que progrediram (normal para lesão). Somente *Gardnerella vaginalis* apresentou significativa diferença na abundância relativa nas amostras que regrediram de lesão para normal, apresentando maior abundância nas amostras com lesão (Figura 4.23).

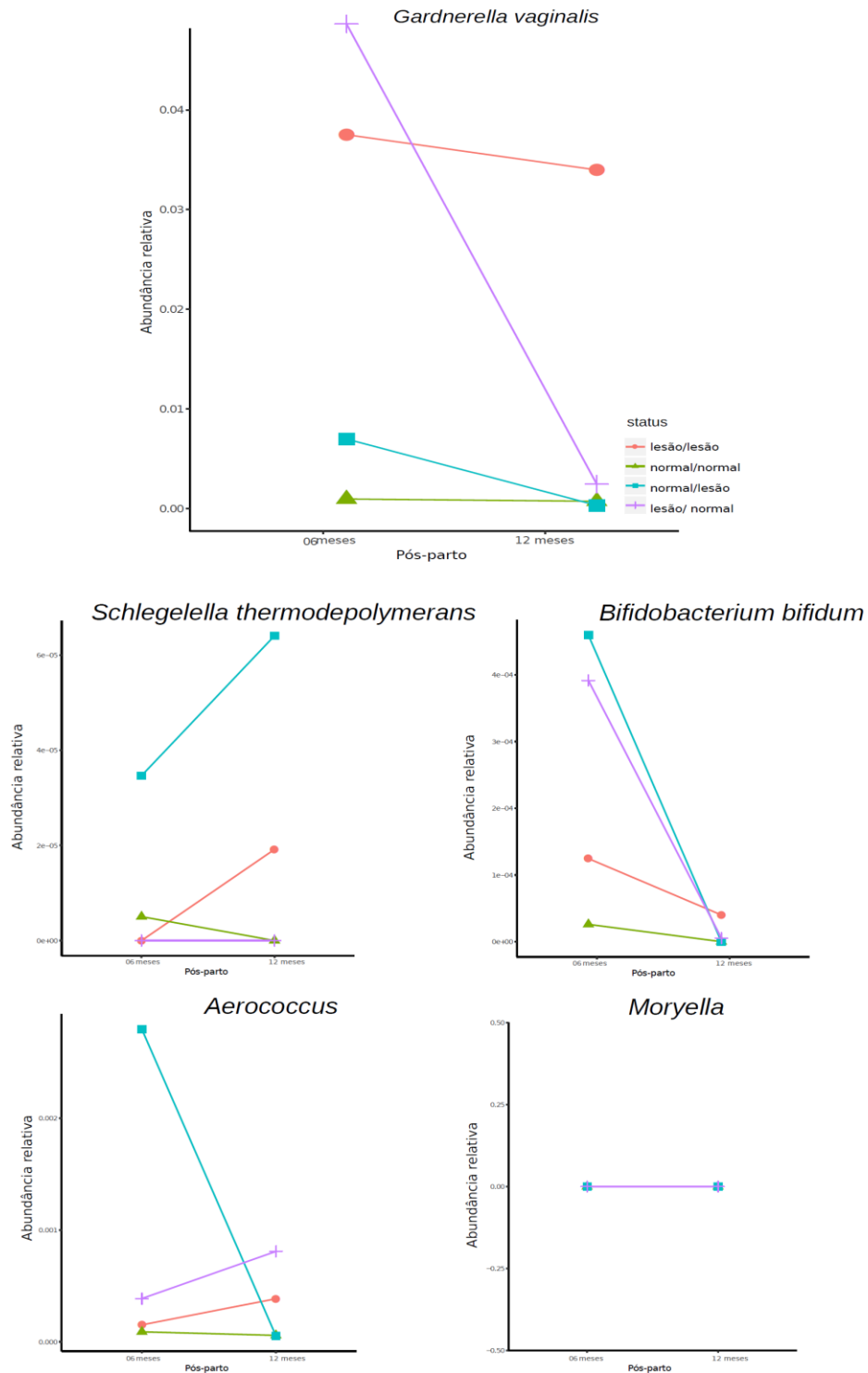


Figura 4.23- Análise longitudinal da abundância relativa de taxa bacterianos em amostras longitudinais pareadas. A abundância relativa para os cinco taxa bacterianos das amostras coletadas nos pontos de seis e doze meses pós-parto que regrediram (lesão para normal) (em roxo), progrediram (normal para lesão) (em azul) ou mantiveram-se normais (em verde) ou com lesão (em rosa) nos resultados da citologia são mostradas na figura. O teste de Wilcoxon foi realizado com intervalo de confiança de 95% e o valor de p foi significativo apenas para o táxon *Gardnerella*, no grupo que regrediu a lesão ($p = 0,043$).

5 Discussão

Mulheres infectadas pelo HIV apresentam maior risco de infecção por HPV, persistência e desenvolvimento de câncer de colo do útero quando comparadas com mulheres HIV-negativas (Aoki e Tosato 2004). No corrente estudo demonstra que mulheres HIV-positivas coinfetadas com HPV no período de 12 meses pós-parto apresentam maior frequência de lesões pré-malignas cervicais do que mulheres no período de seis meses pós-parto. A persistência da infecção por HPV é um fator essencial, mas não suficiente, para o desenvolvimento das lesões cervicais e do câncer de colo do útero. Recentemente, tem sido proposto o papel da disbiose da microbiota cervical no desenvolvimento de doenças cervicais, tais como o câncer de colo de útero (OH et al., 2015; MITRA et al., 2016). Vários estudos mostraram uma associação de microbiota cervical de alta diversidade com a infecção por HPV, desenvolvimento de lesão e do câncer cervical, além de um risco maior para infecção por HIV (LEE et al., 2013; BORGDORFF et al., 2014; GOSMANN et al., 2017). Apesar dos diferentes trabalhos publicados sobre o tema, o perfil da microbiota em mulheres infectadas pelo HIV no período pós-parto é desconhecido.

Mulheres HIV-negativas apresentam no período pós-parto uma microbiota cervical de alta diversidade e este aumento da diversidade se deve provavelmente à queda dos níveis de estrogênio após o parto (MACINTYRE et al., 2015). No presente estudo, o perfil da microbiota cervical em mulheres HIV-positivas no período pós-parto foi descrito. Quatro CSTs identificadas foram denominadas de CSTs III, IV-A, IV-B.1 e IV-B.2, de acordo com estudos prévios (GAJER et al., 2012; BROTMAN et al., 2014; FORNEY; RAVEL, 2014). A CST III apresenta predominância do *Lactobacillus iners*, enquanto as CSTs IV (A e B) são comunidades de alta diversidade dominadas por bactérias anaeróbicas. Não foram encontradas as CSTs I, II e V descritas em estudos anteriores que apresentam predominância das espécies *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii*, respectivamente (RAVEL et al., 2011). O *L. crispatus* (CST I) está presente em alta frequência na microbiota vaginal de mulheres de ascendência europeia e asiática (RAVEL et al., 2011; FETTWEIS et al., 2014). A ausência desta CST entre as nossas amostras é congruente com a observação de que o *L. crispatus* está associado à redução da infecção pelo HIV e geralmente está ausente ou em baixa frequência em mulheres infectadas pelo HIV (GOSMANN et al., 2017). Além disso, a composição das CST é diferente entre grupos étnicos distintos, como, por exemplo, entre grupos de ascendência europeia

e africana. Estudos mostraram que as mulheres de ascendência africana têm maior prevalência de CST IV quando comparadas às de ascendência asiática e europeia (Larry J. Forney e Jacques Ravel 2014; Fettweis et al. 2014). A população brasileira é altamente miscigenada, devido à sua história de colonização (CALLEGARI-JACQUES et al., 2003; SANTOS et al., 2016). Dito isto, não podemos deixar de destacar a possível influência étnica das mulheres deste estudo sobre o perfil da microbiota cervical, já que todas elas apresentam ascendência com forte contribuição africana.

As CSTs IV-A e B são caracterizadas por terem uma grande diversidade de bactérias e uma proporção modesta ou ausente de *Lactobacillus sp.*, enquanto o CST IV-B mostra uma maior frequência de bactérias, como *Prevotella*, *Gardnerella*, *Atopobium*, *Mobiluncus* (GAJER et al., 2012; BROTMAN et al., 2014; FORNEY; RAVEL, 2014). Adicionalmente, neste trabalho foi descrita uma subdivisão da CST IV-B em IV-B.1 (*Gardnerella*-dominante) e IV-B.2 (*Prevotella*-dominante). Entretanto, apesar da formação dos dois *clusters* distintos, não foi observada diferenças significativa entre diversidade pelo índice de Shannon e pela diversidade filogenética.

A CST IV tem sido associado à infecção por HPV e por HIV e a lesões intraepiteliais cervicais (LEE et al., 2013; BORGDORFF et al., 2014; GOSMANN et al., 2017). Este estudo demonstrou que a CST IV (A e B) compreendeu uma alta proporção (59%) entre as amostras, porém não houve diferença significativa na distribuição das CSTs para o status de HPV, a presença de lesão e o período pós-parto (seis *versus* 12 meses). Em congruência com nossos dados, um estudo anterior relatou uma alta frequência da CST IV entre as mulheres positivas para HIV e HPV (DARENG et al., 2016). Além disso, as mulheres HIV-positivas não apresentaram variação significativa na sua microbiota, independentemente do seu status de HPV (positivo ou negativo) (DARENG et al., 2016). Os resultados deste estudo estão de acordo com estudos anteriores (ANAHTAR et al., 2015; DARENG et al., 2016; GOSMANN et al., 2017) e sugerem que as mulheres HIV-positivas apresentam uma comunidade estável de alta diversidade no período pós-parto que não é alterada pela citologia, infecção por HPV ou período pós-parto. Por outro lado, outro estudo de microbioma vaginal de mulheres HIV-negativas de ascendência europeia mostrou uma alta prevalência da CST IV com o aumento da gravidade das lesões cervicais, independentemente do status do HPV (MITRA et al., 2016). Os resultados deste estudo demonstram a importância da investigação da estabilidade

da microbiota de mulheres HIV-negativas em diferentes momentos do período pós-parto, bom como a comparação dos dados com os de mulheres HIV-positivas.

A microbiota pode afetar a susceptibilidade do hospedeiro para infecções virais (VYSHENSKA et al., 2017). Estudos recentes mostraram que a microbiota *L.iners*-dominante (CST III) está associada a uma maior prevalência de infecção virais, como por HIV, HPV e HSV-2 (BORGDORFF et al., 2014). Esta prevalência é ainda maior em mulheres que apresentam alta diversidade da microbiota (CST IV) (BORGDORFF et al., 2014). Entretanto, pouco é conhecido sobre a relação das CSTs com outras infecções virais. Sendo assim, analisamos as CSTs (III e IV) para as quatro famílias virais (Papillomaviridae, Anelloviridae, Herpesviridae e Genomoviridae) descritas em um estudo prévio do grupo (SIQUEIRA, 2017). Foi observada uma distribuição significativa da CST IV para as amostras que apresentavam três famílias virais de DNA circular adicionais encontradas por nosso grupo (Anelloviridae, Herpesviridae e Genomoviridae) com a frequência de *reads* atribuídos igual ou superior a 1%. No entanto, não é totalmente conhecido quais são os mecanismos envolvidos no estabelecimento das infecções virais e como as bactérias da microbiota podem modulá-las. Existem vários estudos que mostraram a associação da infecção por HPV com microbiota de maior diversidade (LEE et al., 2013; BROTMAN et al., 2014; KYRGIU; MITRA; MOSCICKI, 2017). No entanto, pouco é descrito sobre o genótipo associado com os tipos de CSTs. Este estudo descreveu uma maior frequência dos tipos de HPV não-16 para as amostras com CST IV. Vale ressaltar que estes tipos de HPV são menos encontrados em casos de lesões pré-malignas ou de câncer cervical, mas ocorrem com maior frequência em mulheres com grau mais avançado de imunodepressão. Nestes casos, o organismo hospedeiro tem maior dificuldade de eliminar as infecções por estes tipos, o que ocorre mais facilmente em indivíduos imunocompetentes. Embora não tenhamos testado a associação da imunodepressão com os tipos não-16 ou com os casos de CST IV, é plausível especular que este seja o caso aqui observado.

A bactéria *Bifidobacterium*, relatada neste estudo, foi demonstrada e caracterizada em estudos prévios em amostras vaginais de mulheres saudáveis (KORSHUNOV et al., 1999). Estudos recentes descreveram este gênero de bactérias em baixa frequência em pacientes com câncer colorretal e relataram a atividade antitumoral desta bactéria (SIVAN et al., 2015; HUGHES et al., 2017). Foi demonstrada aqui uma possível associação desta bactéria com lesões intraepiteliais cervicais, mas seu papel na microbiota cervical não é totalmente conhecido. O

gênero *Schlegelella* também foi associado positivamente com a lesão cervical, no entanto, seu papel no colo do útero também é desconhecido e até o presente momento não existem dados na literatura para comparação. Estudos demonstraram a presença do DNA bacteriano do gênero *Schlegelella* durante a preparação das amostras com kits de extração de DNA e outros reagentes de laboratório (MOHAMMADI et al., 2005; SHEN; ROGELJ; KIEFT, 2006). A sua presença foi relatada em controles negativos de reações, o que sugere que esta bactéria esteja presente como DNA contaminante em reagentes de kit de extração de ácidos nucleicos (SALTER et al., 2014). No entanto, todas as amostras deste estudo foram tratadas com os mesmos reagentes, e a presença de *Schlegelella* foi observada apenas em amostras com lesões cervicais. Estudos adicionais são portanto necessários para avaliar a associação desta bactéria com lesões cervicais.

Os cinco gêneros bacterianos originalmente associados a lesões cervicais na análise de LEfSe tiveram sua OR estimada. As OR dos gêneros *Moryella* e *Schlegella* foram significativas, de 40x (2,28 - 706) e 3,5x (1,36 - 8,9), respectivamente, enquanto os outros três gêneros não foram significativos. A associação foi confirmada pelo teste de qui-quadrado, o que reforça a robustez da associação dessas duas bactérias com lesões cervicais.

A disponibilidade das amostras longitudinais das 25 participantes para os pontos de seis e 12 meses pós-parto nos permitiu avaliar a associação dos cinco *taxa* descritos anteriormente como biomarcadores para lesões cervicais. Nenhum dos *taxa* apresentou significância na análise longitudinal entre as mulheres que permaneceram com o mesmo status citológico (normal ou lesão) no período de 6 e 12 meses pós-parto. Por outro lado, para as mulheres que evoluíram de normal para lesão (n = 4) ou regrediram de lesão para normal (n = 5), apenas *Gardnerella vaginalis* apresentou abundância relativa significativa em mulheres em que a lesão regrediu. No entanto, entre as mulheres que mudaram de citologia normal para lesões cervicais, a abundância de *G. vaginalis* permaneceu estatisticamente inalterada. Esses dados podem sugerir que *G.vaginalis* pode induzir o desenvolvimento de lesões cervicais ou colonizar o colo do útero após a formação das lesões, e nossos dados não são capazes de distinguir entre estas duas hipóteses. A falta de significância dos outros *taxa* pode ser devido ao pequeno número de amostras pareadas analisadas em cada categoria.

A microbiota cervical exibe uma interação complexa com o meio ambiente local e com o sistema imunológico, desempenhando um papel central na

homeostase cervical. Neste estudo foi demonstrado que as comunidades de microbiota cervical de mulheres HIV-positivas no pós-parto são estáveis, apresentando uma grande proporção de amostras com a microbiota de alta diversidade de bactérias, podendo também ser associada com infecções por diferentes famílias virais. Além disso, foi demonstrado três gêneros bacterianos associados a lesões cervicais, *Moryella*, *Schlegella* e *Gardnerella*, através de análises distintas. Pouco se sabe sobre a função dessas bactérias na homeostase da microbiota cervical, e não é claro como essas bactérias modulam o desenvolvimento do câncer cervical, se surgem antes ou após as lesões cervicais e se são um componente necessário para o desenvolvimento do câncer. Neste estudo, propomos que espécies distintas de microbiota podem servir de sensores para mudanças no microambiente cervical, podendo modulá-lo ou ser modificado por este.

6 Conclusões

Através da metodologia utilizada foi possível identificar quatro grupos de comunidades (CSTs), que foram divididos em CSTs III, IV-A e IV-B (1 e 2). As CSTs III e IV (A e B) foram encontradas em 41 % e 59% das amostras analisadas, respectivamente. Apesar da maior frequência da CST IV, não houve diferença significativa da distribuição das CSTs com o status de HPV, citologia cervical e período pós-parto. Estes resultados sugerem que a microbiota cervical é estável e de alta diversidade, não alterando com estas variáveis de análise. Além disso, a microbiota cervical de alta diversidade pode modular as infecções virais causadas por vírus das famílias Papillomaviridae, Anelloviridae, Herpesviridae e Genomoviridae. Adicionalmente descrevemos três gêneros de bactérias associados à presença de lesões cervicais (*Moryella*, *Schlegella* e *Gardnerella*) confirmados por distintas análises.

Este estudo é o primeiro a descrever o perfil de bactérias e de vírus no período pós-parto de mulheres HIV-positivas com diferentes graus de lesões cervicais, e ressalta a importância de estudos de microbioma em amostras cervicais para a compreensão do papel de possíveis biomarcadores no desenvolvimento de lesões cervicais que precedem o câncer.

7 Referências

ADLER, D.; WALLACE, M.; BENNIE, T.; ABAR, B.; SADEGHI, R.; MEIRING, T.; WILLIAMSON, A.-L.; BEKKER, L.-G. High risk human papillomavirus persistence among HIV-infected young women in South Africa. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 33, p. 219–21, abr. 2015.

AHDIEH, L.; KLEIN, R. S.; BURK, R.; CU-UVIN, S.; SCHUMAN, P.; DUERR, A.; SAFAEIAN, M.; ASTEMBORSKI, J.; DANIEL, R.; SHAH, K. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. **The Journal of infectious diseases**, v. 184, n. 6, p. 682–90, set. 2001.

ALDUNATE, M.; TYSSEN, D.; JOHNSON, A.; ZAKIR, T.; SONZA, S.; MOENCH, T.; CONE, R.; TACHEDJIAN, G. Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 9, p. 2015–25, set. 2013.

ANAHTAR, M. N.; BYRNE, E. H.; DOHERTY, K. E.; BOWMAN, B. A.; YAMAMOTO, H. S.; SOUMILLON, M.; PADAVATTAN, N.; ISMAIL, N.; MOODLEY, A.; SABATINI, M. E.; GHEBREMICHAEL, M. S.; NUSBAUM, C.; HUTTENHOWER, C.; VIRGIN, H. W.; NDUNG’U, T.; DONG, K. L.; WALKER, B. D.; FICHOROVA, R. N.; KWON, D. S. Cervicovaginal Bacteria Are a Major Modulator of Host Inflammatory Responses in the Female Genital Tract. **Immunity**, v. 42, n. 5, p. 965–976, maio 2015.

AOKI, Y.; TOSATO, G. Neoplastic conditions in the context of HIV-1 infection. **Current HIV research**, v. 2, n. 4, p. 343–9, out. 2004.

AUDIRAC-CHALIFOUR, A.; TORRES-POVEDA, K.; BAHENA-ROMÁN, M.; TÉLLEZ-SOSA, J.; MARTÍNEZ-BARNETCHE, J.; CORTINA-CEBALLOS, B.; LÓPEZ-ESTRADA, G.; DELGADO-ROMERO, K.; BURGUETE-GARCÍA, A. I.; CANTÚ, D.; GARCÍA-CARRANCÁ, A.; MADRID-MARINA, V. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153274, 26 abr. 2016.

BÄCKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5717, p. 1915–20, 25 mar. 2005.

BHATT, A. P.; REDINBO, M. R.; BULTMAN, S. J. The role of the microbiome in

cancer development and therapy. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 4, p. 326–344, 8 jul. 2017.

BLEVINS, S. M.; BRONZE, M. S. Robert Koch and the “golden age” of bacteriology. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 9, p. e744–e751, set. 2010.

BODILIS, J.; NSIGUE-MEILO, S.; BESAURY, L.; QUILLET, L. Variable Copy Number, Intra-Genomic Heterogeneities and Lateral Transfers of the 16S rRNA Gene in *Pseudomonas*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35647, 24 abr. 2012.

BORGDORFF, H.; TSIVTSIVADZE, E.; VERHELST, R.; MARZORATI, M.; JURRIAANS, S.; NDAYISABA, G. F.; SCHUREN, F. H.; VAN DE WIJGERT, J. H. Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women. **The ISME Journal**, v. 8, n. 9, p. 1781–1793, 6 set. 2014.

BOUVARD, V.; BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; FREEMAN, C.; GALICHET, L.; COGLIANO, V.; WHO INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER MONOGRAPH WORKING GROUP. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. **The Lancet. Oncology**, v. 10, n. 4, p. 321–2, 1 abr. 2009.

BRAATEN, K. P.; LAUFER, M. R. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. **Reviews in obstetrics & gynecology**, v. 1, n. 1, p. 2–10, 2008.

BROTMAN, R. M.; SHARDELL, M. D.; GAJER, P.; TRACY, J. K.; ZENILMAN, J. M.; RAVEL, J.; GRAVITT, P. E. Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 11, p. 1723–1733, 1 dez. 2014.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F. M.; SALAMONI, S. P.; CROSSETTI, S. G.; FERREIRA, M. E.; HUTZ, M. H. Historical genetics: Spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, v. 15, n. 6, p. 824–834, nov. 2003.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 15 dez. 2009.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J.

I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 11 maio 2010.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus research**, v. 89, n. 2, p. 191–9, nov. 2002.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, n. 31, p. 20–8, 2003.

CHO, I.; BLASER, M. J. Applications of Next-Generation Sequencing: The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nature Publishing Group**, v. 13, 2012.

CLIFFORD, G. M.; SMITH, J. S.; AGUADO, T.; FRANCESCHI, S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 1, p. 101–105, 7 jul. 2003.

DARENG, E. O.; MA, B.; FAMOOTU, A. O.; ADEBAMOWO, S. N.; OFFIONG, R. A.; OLANIYAN, O.; DAKUM, P. S.; WHEELER, C. M.; FADROSH, D.; YANG, H.; GAJER, P.; BROTMAN, R. M.; RAVEL, J.; ADEBAMOWO, C. A. Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women. **Epidemiology and infection**, v. 144, n. 1, p. 123–37, jan. 2016.

DE VILLIERS, E.-M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H.-U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology.**, 2004.

DE VUYST, H.; LILLO, F.; BROUTET, N.; SMITH, J. S. HIV, human papillomavirus, and cervical neoplasia and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy. **European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, v. 17, n. 6, p. 545–54, nov. 2008.

DENG, X.; NACCACHE, S. N.; NG, T.; FEDERMAN, S.; LI, L.; CHIU, C. Y.; DELWART, E. L. An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 7, p. e46, 20 abr. 2015.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical

cancer. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 110, n. 5, p. 525–41, 1 maio 2006.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C.; MURAKAMI, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in medical virology**, v. 25 Suppl 1, n. Suppl Suppl 1, p. 2–23, mar. 2015.

EL, M.; ATTALEB, M.; EL HASSANI, R. A.; KHYATTI, M.; BENBACER, L.; M., M.; AMRANI, M. Evaluation of p53, p16INK4a and E-Cadherin Status as Biomarkers for Cervical Cancer Diagnosis. In: **Topics on Cervical Cancer With an Advocacy for Prevention**. [s.l.] InTech, 2012.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 1 mar. 2015.

FETTWEIS, J. M.; BROOKS, J. P.; SERRANO, M. G.; SHETH, N. U.; GIRERD, P. H.; EDWARDS, D. J.; STRAUSS, J. F.; JEFFERSON, K. K.; BUCK, G. A. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. **Microbiology**, v. 160, 1 out. 2014.

FORNEY, L. J.; RAVEL, J. **Microbial Ecology in States of Health and Disease**. 1st. ed. Washington, D.C.: National Academies Press, 2014.

FOSTER, K. R.; SCHLUTER, J.; COYTE, K. Z.; RAKOFF-NAHOUM, S. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. **Nature**, v. 548, n. 7665, p. 43–51, 2 ago. 2017.

FREGA, A.; SCIRPA, P.; COROSU, R.; VERRICO, M.; SCARCIGLIA, M. L.; PRIMIERI, M. R.; PALAZZO, A.; IACOVELLI, R.; MOSCARINI, M. Clinical management and follow-up of squamous intraepithelial cervical lesions during pregnancy and postpartum. **Anticancer research**, v. 27, n. 4C, p. 2743–6, 2007.

GAJER, P.; BROTMAN, R. M.; BAI, G.; SAKAMOTO, J.; SCHÜTTE, U. M. E.; ZHONG, X.; KOENIG, S. S. K.; FU, L.; MA, Z. S.; ZHOU, X.; ABDO, Z.; FORNEY, L. J.; RAVEL, J. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. **Science translational medicine**, v. 4, n. 132, p. 132ra52, 2 maio 2012.

GAO, Z.; GUO, B.; GAO, R.; ZHU, Q.; QIN, H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 20, 2015.

GARRETT, W. S. Cancer and the microbiota. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 80–86,

abr. 2015.

GLOBOCAN. **GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Cervical cancer**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>>. Acesso em: 20 out. 2007.

GOSMANN, C.; ANAHTAR, M. N.; HANDLEY, S. A.; FARCASANU, M.; ABU-ALI, G.; BOWMAN, B. A.; PADAVATTAN, N.; DESAI, C.; DROIT, L.; MOODLEY, A.; DONG, M.; CHEN, Y.; ISMAIL, N.; NDUNG'U, T.; GHEBREMICHAEL, M. S.; WESEMANN, D. R.; MITCHELL, C.; DONG, K. L.; HUTTENHOWER, C.; WALKER, B. D.; VIRGIN, H. W.; KWON, D. S. Lactobacillus-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities Are Associated with Increased HIV Acquisition in Young South African Women. **Immunity**, v. 46, n. 1, p. 29–37, 17 jan. 2017.

GRAY, H.; WILLIAMS, P. L. (Peter L.; BANNISTER, L. H. **Gray's anatomy: the anatomical basis of medicine and surgery**. 38th. ed. [s.l.] Churchill Livingstone, 1995.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The Human Microbiome: Our Second Genome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 13, n. 1, p. 151–170, 22 set. 2012.

HENDRICK, V.; ALTSHULER, L. L.; SURI, R. Hormonal Changes in the Postpartum and Implications for Postpartum Depression. **Psychosomatics**, v. 39, n. 2, p. 93–101, mar. 1998.

HICKEY, R. J.; ZHOU, X.; PIERSON, J. D.; RAVEL, J.; FORNEY, L. J. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 160, n. 4, p. 267–82, out. 2012.

HLADIK, F.; MCEL RATH, M. J. Setting the stage: host invasion by HIV. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 6, p. 447–457, jun. 2008.

HOUGHTLING, P. D.; WALKER, W. A. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 60, n. 3, p. 294–307, mar. 2015.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 190–7, jun. 1996.

HUGHES, K. R.; HARNISCH, L. C.; ALCON-GINER, C.; MITRA, S.; WRIGHT, C. J.; KETSKEMETY, J.; VAN SINDEREN, D.; WATSON, A. J. M.; HALL, L. J.

Bifidobacterium breve reduces apoptotic epithelial cell shedding in an exopolysaccharide and MyD88-dependent manner. **Open biology**, v. 7, n. 1, jan. 2017.

IMAI, K.; OCHIAI, K. Effect of microbial coinfection with HIV-1 and butyric acid-producing anaerobic bacteria on AIDS progression. **Journal of Oral Biosciences**, v. 55, n. 2, p. 55–60, maio 2013.

INCA. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo do útero**Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva / Ministério da Saúde Brasil, , 2011.

INCA. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva / Ministério da Saúde Brasil, , 2015. .

JALIL, E. M.; BASTOS, F. I.; MELLI, P. P. D. S.; DUARTE, G.; SIMOES, R. T.; YAMAMOTO, A. Y.; MORAIS, R. A. A. de; QUINTANA, S. M. HPV clearance in postpartum period of HIV-positive and negative women: a prospective follow-up study. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 564, 1 dez. 2013.

JANE GEORGE. **GN to start vaccinating girls against HPV**. Disponível em: <http://www.nunatsiaqonline.ca/stories/article/gn_to_start_vaccinating_girls_against_hpv/>. Acesso em: 20 out. 2017.

JOSHI, N.; FASS, J. **Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files [Software]**. Disponível em: <<https://github.com/najoshi/sickle>>.

JOSHUA LEDERBERG. **'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words | The Scientist Magazine®**. Disponível em: <<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/13313/title/-Ome-Sweet--Omics---A-Genealogical-Treasury-of-Words/>>. Acesso em: 20 out. 2017.

KORSHUNOV, V. M.; GUDIEVA, Z. A.; EFIMOV, B. A.; PIKINA, A. P.; SMEIANOV, V. V; REID, G.; KORSHUNOVA, O. V; TIUTIUNNIK, V. L.; STEPIN, I. I. [The vaginal *Bifidobacterium* flora in women of reproductive age]. **Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii**, n. 4, p. 74–8, 1999.

KUMAR, A.; DARCIS, G.; VAN LINT, C.; HERBEIN, G. Epigenetic control of HIV-1 post integration latency: implications for therapy. **Clinical epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 103, dez. 2015.

KURMAN, R. J. **Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract**. 4th. ed. [s.l.] Springer New York, 1994.

KYRGIU, M.; MITRA, A.; MOSCICKI, A.-B. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? **Translational Research**, v. 179, p. 168–182, jan. 2017.

LABORATORY OF TUMOR VIRUS BIOLOGY, N. C. I. **Electron micrograph of human papillomavirus | Biology of Human/World of Viruses**. Disponível em: <<http://worldofviruses.unl.edu/electron-micrograph-of-human-papillomavirus/>>. Acesso em: 20 out. 2017.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357–9, 4 mar. 2012.

LEE, J. E.; LEE, S.; LEE, H.; SONG, Y.-M.; LEE, K.; HAN, M. J.; SUNG, J.; KO, G. Association of the Vaginal Microbiota with Human Papillomavirus Infection in a Korean Twin Cohort. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63514, 22 maio 2013.

LUO, G. G.; OU, J. J. Oncogenic viruses and cancer. **Virologica Sinica**, v. 30, n. 2, p. 83–84, abr. 2015.

MA, B.; FORNEY, L. J.; RAVEL, J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. **Annual review of microbiology**, v. 66, n. 1, p. 371–89, 13 out. 2012.

MACINTYRE, D. A.; CHANDIRAMANI, M.; LEE, Y. S.; KINDINGER, L.; SMITH, A.; ANGELOPOULOS, N.; LEHNE, B.; ARULKUMARAN, S.; BROWN, R.; TEOH, T. G.; HOLMES, E.; NICOHOLSON, J. K.; MARCHESI, J. R.; BENNETT, P. R. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 8988, 11 mar.

MARTIN, D. H. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. **The American journal of the medical sciences**, v. 343, n. 1, p. 2–9, jan. 2012.

MCGUIRE, A. L.; COLGROVE, J.; WHITNEY, S. N.; DIAZ, C. M.; BUSTILLOS, D.; VERSALOVIC, J. Ethical, legal, and social considerations in conducting the Human Microbiome Project. **Genome research**, v. 18, n. 12, p. 1861–4, 1 dez. 2008.

MITRA, A.; MACINTYRE, D. A.; MARCHESI, J. R.; LEE, Y. S.; BENNETT, P. R.; KYRGIU, M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 58, 1 dez. 2016.

MOHAMMADI, T.; REESINK, H. W.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; SAVELKOUL, P. H. M. Removal of contaminating DNA from commercial nucleic acid

extraction kit reagents. **Journal of Microbiological Methods**, v. 61, n. 2, p. 285–288, maio 2005.

MONINI, P.; SGADARI, C.; TOSCHI, E.; BARILLARI, G.; ENSOLI, B. Antitumour effects of antiretroviral therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 11, p. 861–75, nov. 2004.

MUHLEISEN, A. L.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Menopause and the vaginal microbiome. **Maturitas**, v. 91, p. 42–50, set. 2016.

O'HANLON, D. E.; MOENCH, T. R.; CONE, R. A. Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80074, 6 nov. 2013.

OH, H. Y.; KIM, B.-S.; SEO, S.-S.; KONG, J.-S.; LEE, J.-K.; PARK, S.-Y.; HONG, K.-M.; KIM, H.-K.; KIM, M. K. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2015.

ONG, S. H.; KUKKILLAYA, V. U.; WILM, A.; LAY, C.; HO, E. X. P.; LOW, L.; HIBBERD, M. L.; NAGARAJAN, N. Species identification and profiling of complex microbial communities using shotgun Illumina sequencing of 16S rRNA amplicon sequences. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60811, 8 abr. 2013.

PARAMSOTHY, P.; JAMIESON, D. J.; HEILIG, C. M.; SCHUMAN, P. C.; KLEIN, R. S.; SHAH, K. V.; ROMPALO, A. M.; CU-UVIN, S.; DUERR, A. The effect of highly active antiretroviral therapy on human papillomavirus clearance and cervical cytology. **Obstetrics and gynecology**, v. 113, n. 1, p. 26–31, jan. 2009.

PETERSON, J.; GARGES, S.; GIOVANNI, M.; MCINNES, P.; WANG, L.; SCHLOSS, J. A.; BONAZZI, V.; MCEWEN, J. E.; WETTERSTRAND, K. A.; DEAL, C.; BAKER, C. C.; DI FRANCESCO, V.; HOWCROFT, T. K.; KARP, R. W.; LUNSFORD, R. D.; WELLINGTON, C. R.; BELACHEW, T.; WRIGHT, M.; GIBLIN, C.; DAVID, H.; MILLS, M.; SALOMON, R.; MULLINS, C.; AKOLKAR, B.; BEGG, L.; DAVIS, C.; GRANDISON, L.; HUMBLE, M.; KHALSA, J.; LITTLE, A. R.; PEAVY, H.; PONTZER, C.; PORTNOY, M.; SAYRE, M. H.; STARKE-REED, P.; ZAKHARI, S.; READ, J.; WATSON, B.; GUYER, M.; GUYER, M. The NIH Human Microbiome Project. **Genome Research**, v. 19, n. 12, p. 2317–2323, dez. 2009.

PETROVA, M. I.; REID, G.; VANEECHOUTTE, M.; LEBEER, S. *Lactobacillus iners*:

- Friend or Foe? **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 182–191, mar. 2017.
- PETROVA, M. I.; VAN DEN BROEK, M.; BALZARINI, J.; VANDERLEYDEN, J.; LEBEER, S. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 762–792, set. 2013.
- PINZONE, M. R.; FIORICA, F.; DI ROSA, M.; MALAGUARNERA, G.; MALAGUARNERA, L.; CACOPARDO, B.; ZANGHÌ, G.; NUNNARI, G. Non-AIDS-defining cancers among HIV-infected people. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 16, n. 10, p. 1377–88, out. 2012.
- RAJAGOPALA, S. V.; VASHEE, S.; OLDFIELD, L. M.; SUZUKI, Y.; VENTER, J. C.; TELENTI, A.; NELSON, K. E. The Human Microbiome and Cancer. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 10, n. 4, p. 226–234, 1 abr. 2017.
- RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; SCHNEIDER, G. M.; KOENIG, S. S. K.; MCCULLE, S. L.; KARLEBACH, S.; GORLE, R.; RUSSELL, J.; TACKET, C. O.; BROTMAN, R. M.; DAVIS, C. C.; AULT, K.; PERALTA, L.; FORNEY, L. J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement_1, p. 4680–4687, 15 mar. 2011.
- SALTER, S. J.; COX, M. J.; TUREK, E. M.; CALUS, S. T.; COOKSON, W. O.; MOFFATT, M. F.; TURNER, P.; PARKHILL, J.; LOMAN, N. J.; WALKER, A. W. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. **BMC biology**, v. 12, p. 87, 12 nov. 2014.
- SANTOS, H. C.; HORIMOTO, A. V. R.; TARAZONA-SANTOS, E.; RODRIGUES-SOARES, F.; BARRETO, M. L.; HORTA, B. L.; LIMA-COSTA, M. F.; GOUVEIA, M. H.; MACHADO, M.; SILVA, T. M.; SANCHES, J. M.; ESTEBAN, N.; MAGALHAES, W. C.; RODRIGUES, M. R.; KEHDY, F. S. G.; PEREIRA, A. C. A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: the Brazilian set. **European Journal of Human Genetics**, v. 24, n. 5, p. 725–731, 23 maio 2016.
- SAVAGE, D. C. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. **Annu Rev Microbiol**, v. 31, p. 107–33, 1977.
- SAVAGE, D. C. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.000543>, 28 nov. 2003.
- SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 11, p. 800–12, nov. 2013.

SERRAINO, D.; CARRIERI, P.; PRADIER, C.; BIDOLI, E.; DORRUCCI, M.; GHETTI, E.; SCHIESARI, A.; ZUCCONI, R.; PEZZOTTI, P.; DELLAMONICA, P.; FRANCESCHI, S.; REZZA, G. Risk of invasive cervical cancer among women with, or at risk for, HIV infection. **International journal of cancer**, v. 82, n. 3, p. 334–7, 30 jul. 1999.

SHAW, G. M.; HUNTER, E. HIV transmission. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 11, p. a006965–a006965, 1 nov. 2012.

SHEN, H.; ROGELJ, S.; KIEFT, T. L. Sensitive, real-time PCR detects low-levels of contamination by *Legionella pneumophila* in commercial reagents. **Molecular and Cellular Probes**, v. 20, n. 3–4, p. 147–153, jun. 2006.

SHEKIN, D. **Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures**. [s.l.] Chapman & Hall Crc, 2004.

SHULZHENKO, N.; LYNG, H.; SANSON, G. F.; MORGUN, A. Mé nage à trois: an evolutionary interplay between human papillomavirus, a tumor, and a woman. **Trends in Microbiology**, v. 22, p. 345–353, 2014.

SIITERI, P. K.; MACDONALD, P. C. Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 26, n. 7, p. 751–61, jul. 1966.

SIQUEIRA, J. D. **Análise do viroma cervical e identificação de novas linhagens e sublinhagens de HPV em mulheres gestantes coinfectadas HIV/HPV por sequenciamento de nova geração**. 2017. INCA, 2017.

SIVAN, A.; CORRALES, L.; HUBERT, N.; WILLIAMS, J. B.; AQUINO-MICHAELS, K.; EARLEY, Z. M.; BENYAMIN, F. W.; MAN LEI, Y.; JABRI, B.; ALEGRE, M.-L.; CHANG, E. B.; GAJEWSKI, T. F. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. **Science**, v. 350, n. 6264, p. 1084–1089, 27 nov. 2015.

SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M.; RAAB, S.; SHERMAN, M.; WILBUR, D.; WRIGHT, T.; YOUNG, N.; FORUM GROUP MEMBERS; BETHESDA 2001 WORKSHOP. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, v. 287, n. 16, p. 2114–9, 24 abr. 2002.

STEVENS, A. (Pathologist); LOWE, J. S. (James S. **Human histology**. 3rd. ed. [s.l.] Elsevier/Mosby, 2005.

TACHEDJIAN, G.; ALDUNATE, M.; BRADSHAW, C. S.; CONE, R. A. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. **Research in microbiology**, abr. 2017.

Tipos de Câncer/ Câncer do colo de uterino. Disponível em: <<https://www.vencerocancer.org.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-uterino/cancer-de-colo-do-utero-o-que-e/>>. Acesso em: 20 out. 2017.

TRISTRAM, A.; FIANDER, A. Human papillomavirus (including vaccines). **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, v. 17, n. 11, p. 324–329, nov. 2007.

VAN DE WIJGERT, J. H. H. M.; JESPERS, V. The global health impact of vaginal dysbiosis. **Research in Microbiology**, mar. 2017.

VITALI, D.; WESSELS, J. M.; KAUSHIC, C. Role of sex hormones and the vaginal microbiome in susceptibility and mucosal immunity to HIV-1 in the female genital tract. **AIDS research and therapy**, v. 14, n. 1, p. 39, 12 set. 2017.

VYSHENSKA, D.; LAM, K. C.; SHULZHENKO, N.; MORGUN, A. Interplay between viruses and bacterial microbiota in cancer development. **Seminars in Immunology**, jun. 2017.

WALBOOMERS, J. M. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; PETO, J.; MEIJER, C. J. L. M.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1 set. 1999.

WHITE, B. A.; CREEDON, D. J.; NELSON, K. E.; WILSON, B. A. The vaginal microbiome in health and disease. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 10, p. 389–393, out. 2011.

WHO. WHO | Data and statistics. **WHO**, 2017.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 2, p. 221–71, jun. 1987.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088–90, nov. 1977.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 1

jan. 2007.

ZENG, Q.; WU, S.; SUKUMARAN, J.; RODRIGO, A. Models of microbiome evolution incorporating host and microbial selection. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 127, 25 dez. 2017.

ZITKUTE, V.; BUMBULIENE, Z. Risk Factors Affecting HPV Infection, Persistence and Lesion Progression in Women and Men. **Clin Res Infect Dis**, v. 3, n. 2, 2016.

8 Anexos

8.1 Questionário aplicado as pacientes

Nome:		Prontuário n°:	
Endereço:			
Bairro:		Município:	
Telefone:		Outro contato:	
Data de Nascimento: / /		Idade atual:	
Estado civil:	<input type="checkbox"/> Solteira	<input type="checkbox"/> Casada	<input type="checkbox"/> Viúva
		<input type="checkbox"/> Divorciada	<input type="checkbox"/> União Consensual
Escolaridade:	<input type="checkbox"/> Analfabeta	<input type="checkbox"/> 1° Grau	<input type="checkbox"/> 2° Grau
			<input type="checkbox"/> 3° Grau

Usuária de drogas injetáveis:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Tabagismo atual:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
	<input type="checkbox"/> Até 10 cigarros/dia	
	<input type="checkbox"/> 10 a 20	
	<input type="checkbox"/> Mais de 20	

Menarca aos _____ anos			
Primeira relação sexual aos _____ anos			
N° de parceiros sexuais:	<input type="checkbox"/> 1 até 3	<input type="checkbox"/> 4 ou mais	<input type="checkbox"/> Profissionais do sexo
Método contraceptivo:	<input type="checkbox"/> Condom progresso	<input type="checkbox"/> Condom atual	
	<input type="checkbox"/> Anticoncepcional atual	<input type="checkbox"/> Anticoncepcional progresso	
	<input type="checkbox"/> Diu atual	<input type="checkbox"/> Diu progresso	
	<input type="checkbox"/> Outro método - _____		