

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS PASSO FUNDO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA

JOÃO AUGUSTO BERNO FACHIN

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Lactobacillus iners* E NÃO-INERS NA
MICROBIOTA VAGINAL**

PASSO FUNDO/RS

2024

JOÃO AUGUSTO BERNO FACHIN

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES *Lactobacillus iners* E NÃO-INERS NA
MICROBIOTA VAGINAL**

Trabalho de Curso de Graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção de grau de Bacharel em Medicina pela Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo/RS.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jossimara Polettini

PASSO FUNDO/RS

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Fachin, Joao Augusto Berno
Identificação de Espécies de Lactobacillus Iners e
Não-Iners na Microbiota Vaginal / Joao Augusto Berno
Fachin. -- 2024.
70 f.:il.

Orientadora: Doutora Jossimara Polettini

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Passo Fundo,RS, 2024.

1. Lactobacillus iners. 2. Exame ginecológico. 3.
Saúde reprodutiva. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. I.
Polettini, Jossimara, orient. II. Universidade Federal
da Fronteira Sul. III. Título.

JOÃO AUGUSTO BERNO FACHIN

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Lactobacillus iners* E NÃO-INERS NA
MICROBIOTA VAGINAL**

Trabalho de Curso de Graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção de grau de Bacharel em Medicina pela Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo/RS.

Este Trabalho de Curso foi defendido e aprovado pela banca em: 13/11/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Jossimara Poletini - UFFS

Orientadora

Prof.^a Dr.^a Giovana Paula Bonfanti Donato

Avaliadora

Prof.^a Ma. Daniela Augustin Silveira

Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família que assim como Dédalo moldaram asas e confiaram seu Ícaro aos perigos do sol e do mar. Espero me manter em curso. Com amor.

Agradeço minha orientadora Jossimara Polettini por absolutamente tudo, tenho certeza que esse trabalho não seria um por cento do que é sem sua ajuda. Obrigado por aguentar minhas perturbações infinitas e por confiar ainda quando tudo era indefinido. Obrigado pela disponibilidade de ensinar e de aprender junto comigo.

Agradeço todas as maravilhosas pessoas que essa cidade fez possível conhecer, tornando-se parte da minha vida e mudando-a, entre elas Alessandra, Carolina, Jackson, Julio, Rilary, Victoria e Vinicius.

Agradeço ao futuro que tão bem tomou cuidado comigo em todos os momentos, mesmo quando achei que não haveria nenhum.

Agradeço a mim mesmo. Obrigado.

Esse universo, doravante sem dono, não lhe parece estéril nem fútil. Cada grão dessa pedra, cada fragmento mineral dessa montanha cheia de noite forma por si só um mundo. A própria luta para chegar ao cume basta para encher o coração de um homem. É preciso imaginar Sísifo feliz. (Camus, 2019, p. 102)

APRESENTAÇÃO

O presente refere-se a um Trabalho de Curso (TC), elaborado pelo acadêmico João Augusto Berno Fachin, em orientação da Prof.^a Dr.^a Jossimara Polettini, tendo por finalidade ser um requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina pela Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Passo Fundo/RS e está de acordo com os normativos: Manual de Trabalhos Acadêmicos da UFFS e Regulamento de TC do Curso. É composto pelo projeto de pesquisa, relatório de atividades e artigo científico, que foram desenvolvidos ao longo de três semestres, nos módulos de Trabalho de Curso I (2023/2), II (2024/1) e III (2024/2). Durante a primeira etapa, desenvolveu-se o projeto de pesquisa; na segunda, o Relatório de Pesquisa, que engloba principalmente a coleta de dados; finalmente, no último semestre, houve a produção de um artigo científico, trazendo a análise e interpretação estatística de resultados obtidos.

RESUMO

As espécies de Lactobacilos conferem um pH ideal para microbiota vaginal, e tem efeito protetor na proliferação de outros microrganismos patogênicos. No entanto, nos últimos anos, notou-se uma mudança de paradigmas no que se tratava dos papéis atribuídos aos Lactobacilos na microbiota vaginal, observando-se que nem todos possuíam a mesma função protetiva ou conectada com a saúde do trato genital inferior. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é determinar as espécies de lactobacilos vaginais em uma amostra de mulheres de ambulatório do Sistema Único de Saúde (SUS) na cidade de Passo Fundo, no estado do Rio Grande do Sul, identificando-os entre as espécies de *L. iners* e não *iners*. Para a realização do projeto, foram utilizados dados e conteúdo biológico de amostras cérvico-vaginais coletado junto ao Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal da Fronteira Sul. Dentro do grupo amostral maior, estimado em $n = 200$, foram randomicamente selecionadas mulheres em período reprodutivo e aptas para análise molecular, que, então, foram submetidas à técnica de rt-PCR para identificação das espécies de *lactobacillus* de interesse, determinando-se a abundância relativa de *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners* e *L. vaginalis*. Em seguida, os dados obtidos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn, e também em uma análise em duas partes com o teste de Chi-Quadrado de Pearson (significância de 5%): na primeira, junto a dados das variáveis obtidas pelo questionário aplicado às pacientes, estudando a relação entre as características socioeconômicas e a identificação de cada uma das espécies; na segunda etapa, entre a relação da quantificação relativa de *L. iners* e sinais/sintomas clínicos. A amostra final foi composta por 53 mulheres, em sua maioria brancas e com idades entre 18 e 44 anos, com predomínio de queixas clínicas relacionadas a dispareunia e dor. A avaliação estatística revelou que a abundância relativa de *L. iners* e *L. crispatus* diferiu significativamente em relação aos demais lactobacilos ($p < 0,05$), sendo os mais prevalentes, mas não houve diferença significativa entre si. Também, a abundância das espécies de lactobacilos vaginais não se relaciona com características sociodemográficas, comportamentais ou sintomatologia específica, porém a predominância de *L. iners* sugere alerta quanto a outros fatores que podem conjuntamente favorecer uma disbiose de uma microbiota considerada normal.

Palavras-chave: *Lactobacillus iners*; Exame Ginecológico; Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

The Lactobacilli species confer an ideal pH to the vaginal microbiota, and has a protective effect in proliferation of other pathogenic microorganisms. However, in the last few years, a paradigm shift has been noticed on the role assigned to Lactobacilli in the vaginal microbiota, being observed that not every type had the same protective role. In this context, the objective of this paper is to determine the species of vaginal lactobacilli in a sample of women from a SUS outpatient clinic in the city of Passo Fundo, in the state of Rio Grande do Sul, identifying them in species of *L. iners* and non-*iners*. For the execution of the project, data and biological material collected in the Gynecology and Obstetrics Ambulatory Clinic of the Universidade Federal da Fronteira Sul were used. Within the larger sample group, estimated at $n = 200$, women of reproductive age, eligible for molecular analysis, were randomly selected and subsequently subjected to the rt-PCR technique to identify the *lactobacillus* species of interest, determining the relative abundance of *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners*, and *L. vaginalis*. Then, we analyzed the data using the Kruskal-Wallis and Dunn tests, as well as a analysis with Pearson's Chi-Square test in two parts (5% significance level): in the first stage, data were analyzed alongside the variables obtained from the questionnaire administered to the patients, in order to examine the relationship between socioeconomic characteristics and the identification of each species; in the second stage, the relationship between the relative quantification of *L. iners*, *L. crispatus* and *L. jensenii* and clinical signs/symptoms was examined. The final sample consisted of 53 women, predominantly white, aged between 18 and 44 years, with a predominance of clinical complaints related to dyspareunia and pain. Statistical evaluation revealed that the relative abundance of *L. iners* and *L. crispatus* differed significantly from the other lactobacilli ($p < 0.05$), with these being the most prevalent, but with no significant difference between them. Additionally, the abundance of vaginal lactobacilli species was not associated with sociodemographic or behavioral characteristics, nor with specific symptoms. However, the predominance of *L. iners* suggests a potential alert regarding other factors that could collectively favor dysbiosis within a microbiota considered normal.

Keywords: *Lactobacillus iners*; Gynecological Examination; Polymerase Chain Reaction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. DESENVOLVIMENTO	13
2.1 PROJETO DE PESQUISA	13
2.1.1 Tema.....	13
2.1.2 Problemas.....	13
2.1.3 Hipóteses.....	13
2.1.4 Objetivos	14
2.1.4.1 Objetivo Geral	14
2.1.4.2 Objetivos Específicos	14
2.1.5 Justificativa	14
2.1.6 Referencial Teórico.....	15
2.1.6.1 Microbiotas vaginais: os CSTs (<i>Community State Types</i>)	15
2.1.6.2 Fatores epidemiológicos associados à CST III	16
2.1.6.4 Características genômicas, bioquímicas e imunológicas do <i>L. iners</i>	19
2.1.6.5 Controvérsias sobre o papel protetor do <i>Lactobacillus iners</i>	23
2.1.6.6 A técnica de PCR.....	23
2.1.7 Metodologia	24
2.1.7.1 Tipo de Estudo.....	24
2.1.7.2 Local e Período de Realização	24
2.1.7.3 População e Amostragem	25
2.1.7.4 Variáveis, Instrumentos e Coleta de Dados	25
2.1.7.5 Processamento, Controle de Qualidade e Análise dos Dados	28
2.1.7.6 Aspectos Éticos	28
2.1.7.7 Recurso.....	29
2.1.7.8 Cronograma.....	29
ANEXO 01 – Questionário aplicado às pacientes.....	34
ANEXO 02 – Pareceres Consubstanciados do CEP	38
2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA.....	55
2.2.1 Apresentação	55
2.2.2 Alterações de Protocolo	55
3 ARTIGO CIENTÍFICO	59
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70

1. INTRODUÇÃO

A microbiota vaginal é, talvez, um dos ecossistemas mais complexos presentes no corpo humano. Composta por um número limitado de espécies, nas últimas décadas se tornou uma das grandes apostas para o papel de protagonista no bem-estar do sistema e ciclo reprodutivo feminino. Os lactobacilos, divididos em diversos grupos de predomínio, são os principais responsáveis por manter a homeostase do ambiente, evitando a colonização por outros microrganismos potencialmente patogênicos e formando uma primeira barreira de proteção (Wijgert *et al.*, 2014).

Com o avanço de técnicas e tecnologias moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), microarranjos de DNA (*microarrays*) e o pirosequenciamento gênico, os microrganismos, tanto patógenos quanto benéficos, têm sido melhor caracterizados (Chee; Chew; Than, 2020). É nesse sentido que o estudo de Ravel *et al.* (2011) consegue, pela primeira vez, fazer uma descrição detalhada das comunidades vaginais, propondo sua existência em um equilíbrio dinâmico, que, como hoje se sabe, pode ser afetado por uma variedade de fatores, tanto internos quanto externos (Chen *et al.*, 2021). São compreendidos, portanto, segundo os autores referidos, 4 comunidades (chamadas de *Community State Type* (CST)) dominadas por espécies de *Lactobacillus* (I, II, III e V) e uma com grupos diversos de bactérias (IV).

No Brasil, Marconi *et al.* (2010), demonstraram, em um dos maiores trabalhos a nível nacional, que aproximadamente 95% da população estudada abrigava um dos seguintes grupos, por ordem crescente: CST IV (27,4%), CST I (30,5%), representado pelo *Lactobacillus crispatus* e, finalmente, CST III (36,5%), dominado pelo *Lactobacillus iners*. Outro ponto de importância notado, devido aos efeitos negativos de uma microbiota com depleção de *Lactobacillus*, é o fato de a região Sul estar associada com uma menor taxa de prevalência da CST IV.

Em especial, o grupo de CST III, com o passar do tempo acabaria por despertar uma série de dúvidas quanto a não ser tão benéfico quando comparado a outras espécies, estando relacionado principalmente com infecções por cândida (Tortelli *et al.*, 2020) e HPV (Brotman *et al.*, 2014; Norenhag *et al.*, 2019), além de adversidades gestacionais, como partos prematuros (Kindinger *et al.*, 2017). Tais dados, ainda recentes na literatura, se mostram preocupantes, pois colocam em risco a saúde ginecológica de milhões de mulheres pelo mundo.

Uma análise mais detalhada da presença e papel da candidíase na conjuntura dá-se como um ótimo exemplo sobre a interação entre o balanço dos elementos que formam esse complexo

sistema. Causada por vários tipos de cândida, mas sobretudo a *Candida albicans*, muitas mulheres colonizadas são assintomáticas, porém, parte das pacientes pode vir a experimentar sintomas como corrimento esbranquiçado, prurido, irritação e dispareunia (Sobel, 2007). Diversos estudos recentes vêm demonstrando que, ao contrário do apontamento feito para o *L. iners*, a predominância de outras espécies de *Lactobacillus* pode ser um fator protetor, inibindo o crescimento e a formação de hifas do fungo em questão (Madhivanan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Nessa perspectiva, a determinação das espécies de microrganismos colonizadores da cavidade vaginal apresenta-se como um tópico que poderá auxiliar, em um futuro próximo, no maior entendimento sobre a fisiopatologia de doenças e infecções frequentes na população feminina, além de possibilitar tratamentos mais otimizados para elas (Mei e Li, 2022). Assim, o trabalho se posiciona ao tentar contribuir no retrato da cena atual, tendo enfoque as características epidemiológicas de mulheres atendidas pelo SUS na cidade de Passo Fundo, buscando contribuir para um melhor entendimento da situação demográfica frente aos avanços científicos.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 PROJETO DE PESQUISA

2.1.1 Tema

Determinação de espécies de *Lactobacillus* na microbiota vaginal de pacientes atendidas em ambulatórios no Sistema Único de Saúde (SUS) na cidade Passo Fundo/RS.

2.1.2 Problemas

Qual a prevalência das principais espécies de *Lactobacillus* em mulheres atendidas em ambulatórios no SUS?

Quais as características e queixas clínicas mais prevalentes na amostra analisada?

Qual a relação entre as características epidemiológicas, demográficas, de comportamento sexual e de queixas clínicas das mulheres e as diferentes espécies de *Lactobacillus*?

Qual a prevalência de *Candida* spp. nas mulheres da amostra?

Qual a relação entre o predomínio de *Lactobacillus iners* e o diagnóstico de candidíase?

2.1.3 Hipóteses

A prevalência total de mulheres com predominância de *Lactobacillus iners* é de aproximadamente 35%, enquanto que a de *L. crispatus* é de 31%, a de *L. gasseri* sendo 4% e, finalmente, a de *L. jensenii* de 1%.

A maior parte das mulheres da amostra são de etnia branca, com uma variação de idade entre 15 e 48 anos. As queixas clínicas mais frequentes são leucorreia, dor e dispaurenia.

Há predominância de *L. iners* em mulheres com menor nível educacional, comportamento sexual de risco (sexo desprotegido), porém tal predominância é semelhante entre mulheres brancas e não brancas. As queixas clínicas são mais frequentes no grupo com predominância de *L. iners*.

A prevalência de *Candida spp.* em mulheres de amostra é de 20 a 30%.

Há maior prevalência de candidíase em mulheres que apresentam predominância de *L. iners* na microbiota vaginal.

2.1.4 Objetivos

2.1.4.1 Objetivo Geral

Determinar a prevalência das espécies de *Lactobacillus iners* e não *iners* na microbiota vaginal de mulheres atendidas em ambulatórios do Sistema Único de Saúde (SUS).

2.1.4.2 Objetivos Específicos

Descrever as principais características epidemiológicas, sociodemográficas e de queixas ginecológicas mais prevalentes nas pacientes e relacionar com a presença de *Lactobacillus spp.*

Verificar a prevalência de candidíase na amostra.

Relacionar a predominância de *L. iners* com a candidíase.

2.1.5 Justificativa

Nos últimos anos, o estudo dos diferentes microbiomas humanos tem sido destaque na comunidade científica, por sua capacidade de modular diversos aspectos do organismo humano. Conforme o avanço de técnicas dentro da biologia molecular, como o sequenciamento e a área da metagenômica, abre-se um novo leque de perguntas, potencialidades e possibilidades. Entre eles encontra-se a microbiota vaginal, composta por diversos tipos de microrganismos – em especial, os *Lactobacillus spp.* –, protagonistas da homeostasia e na manutenção da saúde ginecológica.

No entanto, pesquisas recentes, que possibilitaram a identificação das espécies mais predominantes e suas características, têm aberto espaços para debates, em particular, sobre o menor papel protetivo do *Lactobacillus iners* quando comparado a outras espécies.

Conhecer as características demográficas, epidemiológicas e sociais relacionadas à predominância do *L. iners* permite acessar e identificar de maneira mais contundente os grupos populacionais mais predispostos a riscos, como de Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) e adversidades gestacionais, como partos prematuros, e coordenar cuidados para o diagnóstico e tratamento. Além disso, o predomínio de *L. iners* relaciona-se a outras doenças que afetam o sistema reprodutor feminino, como o caso de candidíases recorrentes, e, o entendimento dessa interrelação permitirá, futuramente, o desenvolvimento de métodos probióticos para sua resolução.

Destaca-se ainda a necessidade de que novas pesquisas sejam realizadas na área, em particular em locais onde estudos ainda são escassos, em especial no Brasil, e, no Rio Grande do Sul, onde nenhum estudo específico foi arquitetado.

2.1.6 Referencial Teórico

2.1.6.1 Microbiotas vaginais: os CSTs (*Community State Types*)

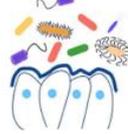
O corpo humano carrega em si um mutualismo em sua natureza. Em todo o organismo, como na pele, intestinos e quaisquer outra superfície, encontram-se diferentes ecossistemas que convivem e fazem trocas mutualísticas com seu portador. Um dos fatores mais surpreendentes é a capacidade de um sistema tão complexo também ser tão diverso, variando não somente de indivíduo para indivíduo, mas em auto variação com o passar do tempo (Costello *et al.*, 2009).

Com o advento de novas técnicas na biologia molecular, Ravel *et al.* (2011) puderam investigar a microbiota vaginal e as espécies mais detalhadamente pela primeira vez. Notou-se que, diferentemente de outras regiões do corpo humano, a maior parte das amostras microbianas vaginais são dominadas por um tipo específico bacteriano, os *Lactobacillus* spp. No entanto, em alguns casos, tal microbioma apresenta uma maior quantidade de microrganismos diversos, com predominância de formas cocáceas anaeróbias, o que é usado como fator diagnóstico para a vaginose bacteriana (Nugent; Krohn; Hillier, 1999).

Dentre os *Lactobacillus* spp. que colonizam o microambiente vaginal, pelo menos 4 espécies predominantes foram identificadas, e a maior abundância dos mesmos caracteriza as chamadas CSTs, (*Community State Types*, ou, comunidades microbianas). Nesse contexto, foram descritas a CST I, dominada pelo *Lactobacillus crispatus*; CST II, com predomínio de *L. gasseri*; CST III, com um maior número de *L. iners*; CST IV, que, apesar de não ser dominada por nenhum tipo de lactobacilo, ainda, em sua grande parte, os têm presente. Importante

ressaltar que a CST IV está fortemente ligada ao crescimento de bactérias tipicamente anaeróbicas, que podem resultar, por exemplo, em um risco maior para ISTs (Zheng *et al.*, 2021). Finalmente, a CST V, representada pelo predomínio de *L. jensenii*. Pode-se dizer, dessa forma, que a microbiota humana vaginal seja caracterizada por uma diversidade extremamente baixa (Ravel *et al.*, 2011). A Figura 01 apresenta um resumo de algumas características pertinentes de cada comunidade.

Figura 01 – Resumo sistemático de características da microbiota vaginal observadas em diferentes comunidades microbianas (CSTs)

Microbiota Vaginal Saudável Dominada por <i>Lactobacillus</i>	Saudável ou Transicional?	Disbiose – VB
<p>Predomínio – <i>L. crispatus</i> 26.2 % (Brancas/Asiáticas)</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Produção de ácido láctico mais alto: pH 4 - Comunidade vaginal relativamente estável * Mais suscetível a transição para a dominada por <i>L. iners</i> * Menos suscetível a transição para estado de VB - Menor prevalência de ISTs virais - Genoma central (10 cepas) * Fatores de adesão ao hospedeiro * Fatores à exclusão competitiva de <i>G. vaginalis</i> <p>Transição facilitada a estado de não VB</p>	<p>Predomínio – <i>L. iners</i> 34.1 % (Brancas/Asiáticas)</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Produção moderada de ácido láctico: pH 4,4 - Isolado tanto de estados saudáveis quanto de vaginose bacteriana - É o spp. dominante após tratamento para vaginose bacteriana - Frequentemente isolado do microbioma vaginal em transição - Mecanismos de adaptação: *Sistema CRISPR/ *Genes ferro-enxofre/ *Citolisina dependente de colesterol/ *Enzimas metabólicas de mucina e glicogênio <p>Transição facilitada a estado de VB</p>	<p>Crescimento excessivo de bactérias anaeróbicas facultativas/obrigatórias</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Nenhuma/baixa produção de ácido láctico: pH 5,3 - Alto score de Nugent - Biofilme polimicrobiano com <i>G. vaginalis</i> - Facilitação à aquisição de ISTs
<p>Predomínio – <i>L. gasseri</i> 6.3 % (Brancas/Asiáticas)</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Menor produção de ácido láctico: pH 5 - Estabilidade da comunidade vaginal relativamente estável * Raras transições a outras comunidades 	<p>Sem predomínio de <i>Lactobacillus</i> 27 % (Negras/Hispânicas)</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Abundantes spp. mantêm um pH baixo: pH 4-5 - Baixo score de Nugent - Saudável ou estado de vaginose bacteriana assintomática? <p>Transição facilitada a estado de VB</p>	
<p>Predomínio – <i>L. jensenii</i> 5.3 % (Brancas/Asiáticas)</p>  <ul style="list-style-type: none"> - Produção moderada de ácido láctico: pH 4,7 - Sem informações sobre estabilidade 		

Fonte: Adaptado de Petrova *et al.* (2015, p. 3).

2.1.6.2 Fatores epidemiológicos associados à CST III

Os estudos sobre a caracterização das CSTs ainda são escassos, mas os dados disponíveis são promissores. No Brasil, um estudo com mulheres de todas as regiões do país identificou que aproximadamente dois terços apresentaram CST III (36,5%), seguidos de 27,4% da CST IV, 4,4% da CST II e 1,2% da CST V (Marconi *et al.*, 2020). As CSTs III e IV estão relacionadas a um aparente menor e controverso papel protetor contra disbioses e o desenvolvimento de vaginose bacteriana (Janneke *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2021).

Estudo recente demonstrou que o domínio de *L. iners* foi menor em mulheres que completaram o ensino médio (52,70%), quando comparado com mulheres que não completaram

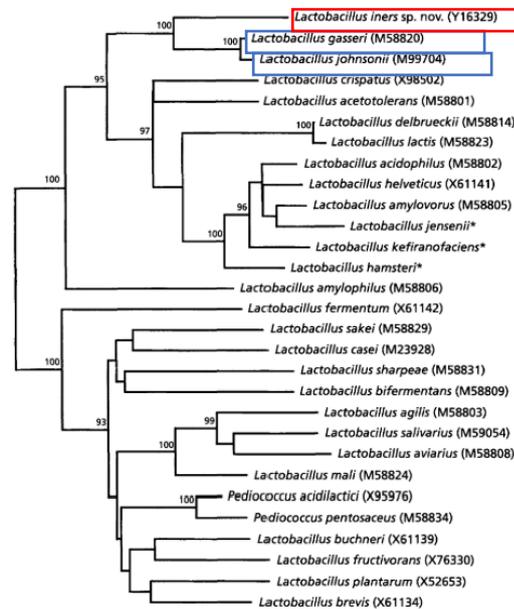
(66,36%). Por outro lado, a presença dessa bactéria foi maior em mulheres com prática de sexo desprotegido e um número maior do que dois parceiros sexuais no último ano; de forma interessante, uma dieta com consumo de laticínios também parece estar vinculada inversamente com essa prevalência (Novak *et al.*, 2022).

O estudo de Marconi *et al.* (2020) difere do de Ravel *et al.* (2010) ao não encontrar diferenças significativas entre a predominância dos microbiomas e a etnia das pacientes. Os últimos descrevem que a presença de CST IV em mulheres hispânicas (34,3%) e negras (38,9%) se apresentava como super-representado quando comparado com mulheres asiáticas (17,6%) e brancas (9,3%). Por outro lado, o primeiro estudo incluiu pacientes brasileiras, com grande miscigenação, o que pode representar que cada população pode ter um padrão diferente de microbiota considerada comum e normal.

2.1.6.3 Características gerais do *Lactobacillus iners*

A primeira descrição do *L. iners* ocorreu por trabalho de Falsen *et al.* (1999). Os autores documentaram a bactéria como células arredondadas, de crescimento fastidioso (visto que não crescem no ágar MRS ou Rogosa, que são específicos para o *Lactobacillus* spp.), somente em ágar sangue. Ainda, são catalase-negativos, anaeróbios facultativos e coram Gram-positivo. É expresso ainda que as colônias são pequenas, circulares e não pigmentadas. Filogeneticamente, como mostra a Figura 02, foram classificados mais proximamente de *L. gasseri* e *L. johnsonii*.

Figura 02 – Árvore filogenética proposta por Falsen *et al.* (1999).

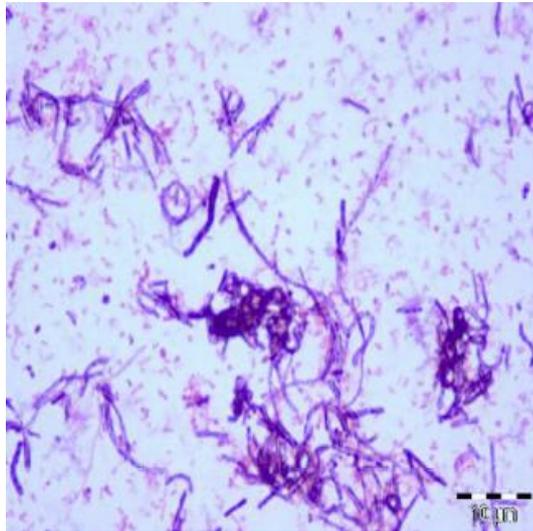


Fonte: Falsen *et al.* (1999, p. 220).

Porém, recentes estudos têm revisitado a coloração determinada da bactéria, propondo que nem todos os *L. iners* são corados como Gram positivos. Em experimentos com misturas artificiais dessa com outras bactérias, notou-se a ambiguidade de coloração. Na Figura 03, observa-se a mistura em iguais quantidades de *L. iners* e *L. crispatus* (Gram-positivo), e, na Figura 04, de *L. iners* e *Streptococcus agalactiae*, mostrando que a bactéria pode apresentar-se, em algumas condições, como Gram negativas (Vaneechoutte, 2017).

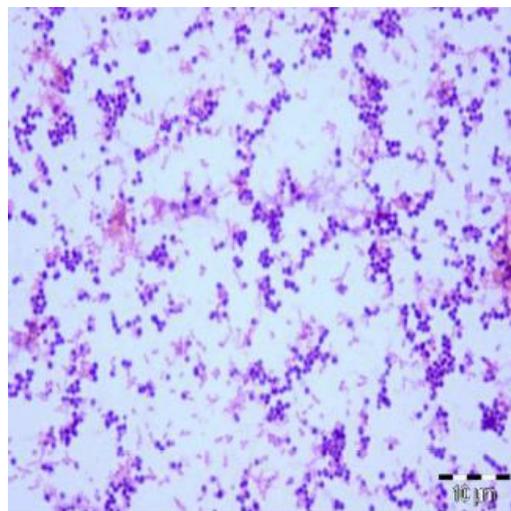
Em análises feitas com microscopia eletrônica de transmissão, observou-se que a parede de peptidoglicano era muito fina quando comparada com a de organismos Gram-negativos. Além dessa característica, o *L. iners* manteve seus genes ligados a transportadores de membrana, o que pode indicar uma utilização maior de compostos do hospedeiro, o que seria, em hipótese, uma vantagem evolutiva para prosperar no ambiente vaginal ante a outros competidores (Kim *et al.*, 2020).

Figura 03 – Fotomicrografia de esfregaço de cultura bacteriana, corado por Gram, mostrando mistura de *Lactobacillus iners* e *Lactobacillus crispatus*



Fonte: Vanechoutte (2017, p. 830).

Figura 04 – Fotomicrografia de esfregaço de cultura bacteriana, corado por Gram, mostrando mistura de *Lactobacillus iners* e *Streptococcus agalactiae*



Fonte: Vanechoutte (2017, p. 830)

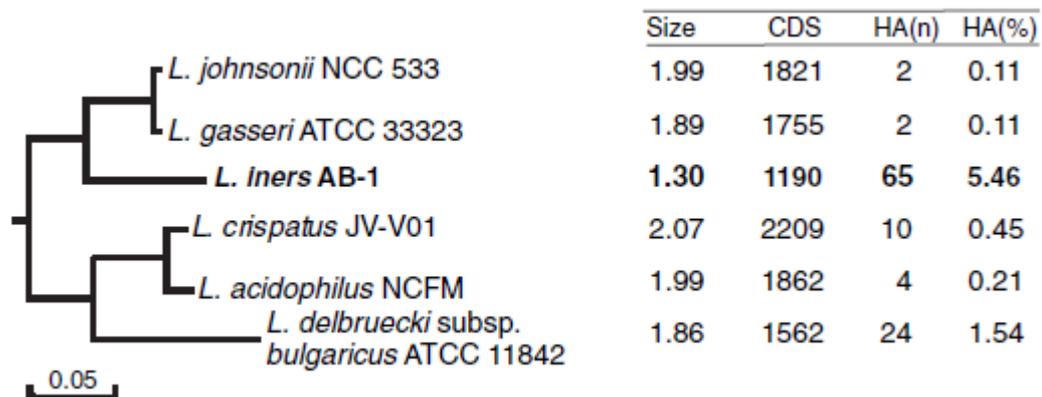
2.1.6.4 Características genômicas, bioquímicas e imunológicas do *L. iners*.

Morris, Lenski e Zinser (2012) iniciam o artigo de grande impacto na biologia e ecologia que construiu a Hipótese da Rainha Negra (“*The Black Queen Hypothesis*”) com uma declaração que muito bem sintetiza o papel evolutivo do *Lactobacillus iners*:

Existe uma tendência no discurso evolucionista de descrever a história da vida como uma progressão direcionada a uma complexidade crescente. Entretanto, não há razão para esperar que essa complexidade será vantajosa adaptativamente em todos os casos e para todas as espécies (Morris, Lenski e Zinser, 2012, p. 1, Tradução Nossa).

De fato, o genoma dessa espécie é acentuadamente pequeno, sendo aproximadamente de 1,3 milhões de pares de bases, um pouco mais da metade do que *L. crispatus* (Macklaim *et al.*, 2010), o que pode ser observado, comparativamente, na Figura 05.

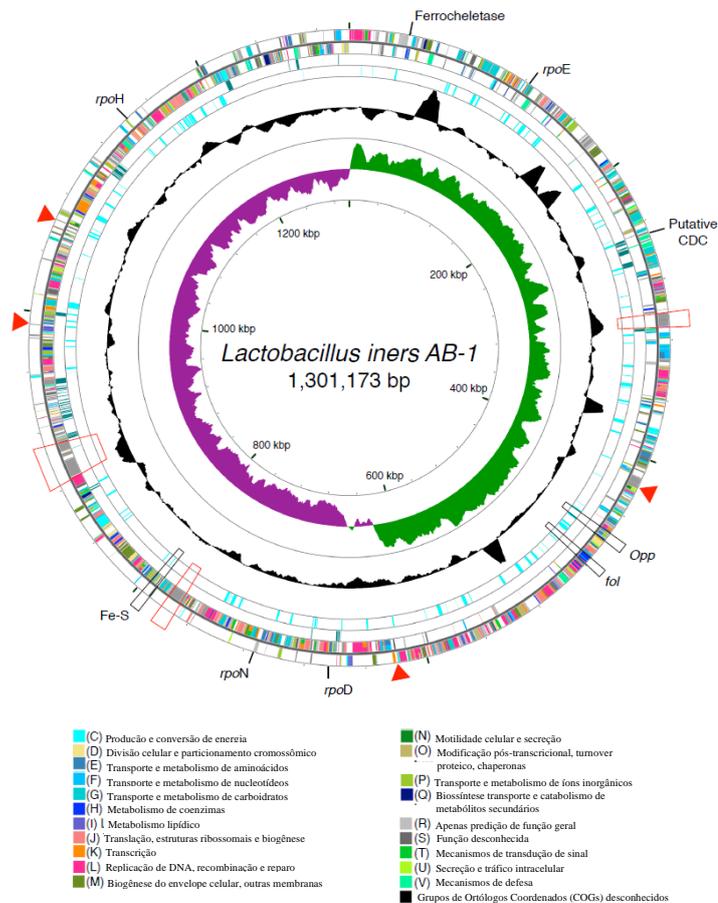
Figura 05 – Árvore filogenética e quadro comparativo de algumas características genômicas de espécies de *Lactobacillus*. (Size: tamanho em pares de bases; CDS: número de sequências codificantes; HA(n): número de genes adquiridos horizontalmente; HA(%): porcentagem de sequências codificantes adquiridas horizontalmente).



Fonte: Macklaim *et al.* (2010, p.4689).

Em resumo, a hipótese traz o conceito de que organismos tendem, durante sua adaptação ao ambiente, como nesse caso o vaginal, a terem seu genoma reduzido caso o hospedeiro possa fornecê-lo de nutrientes, assim, perdendo a capacidade de sintetizá-los. No contexto evolutivo, alguns genes se tornam excessivamente custosos para serem carregados em determinados ambientes, e, análogos à rainha de Espadas do jogo de Copas, devem ser eliminados para uma melhor adequação (Morris; Lenski; Zinser, 2012). Um mapa genômico do *Lactobacillus AB-1*, juntamente com a legenda de cores sobre alguns genes de importância pode ser visto na Figura 06, na qual notam-se algumas peculiaridades interessantes, como o terceiro anel, de cor verde escura, que aponta *Open Reading Frames* (ORFs) que, suspeita-se, terem sido adquiridos horizontalmente (Macklaim *et al.*, 2010).

Figura 06 – Mapa genômico do *Lactobacillus iners* AB-1.



Fonte: adaptado de Macklaim *et al.* (2011, p. 4689)

Para o escopo desse trabalho, considera-se relevante uma razoável explanação nos mecanismos metabólicos desenvolvidos pela bactéria. Até recentemente, pensava-se que o fator antimicrobiano protetor produzido pelos lactobacilos era o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo, inclusive, um dos fatores para a seleção para produção de probióticos (Klebanoff *et al.*, 1991; Falagas, Betsi e Athanasiou, 2007). Porém, novos estudos, que serão discutidos a seguir, abrem novas considerações.

Em estudo de O'Hanlon, Moench e Cone (2011), observou-se que concentrações fisiológicas de H_2O_2 não eram capazes de exercer uma atividade antimicrobiana, inativando, inclusive, quando presentes em concentrações mais altas, mais especificamente os lactobacilos. Além disso, é indicado que essa falha no empreendimento possa ser advinda de uma inativação do composto químico pelo fluido cervicovaginal e o sêmen, sendo, por conseguinte, implausível seu papel como primeira barreira protetiva (O'Hanlon *et al.*, 2011).

Com tais indicativos, muito tem se pesquisado sobre o protagonismo, na verdade, do ácido láctico como fator protetivo no contexto ginecológico. Sabe-se que o produto final da fermentação do glicogênio por lactobacilos predominantes na vagina pode resultar em ácido láctico, porém, há uma divisão entre a possibilidade de tal produção de cada um dos isômeros. Enquanto *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii* possuem a capacidade de produzir tanto D- e L-ácido láctico, o *L. iners* só consegue completar a via metabólica do L-ácido láctico, visto a ausência do código genético para produção de D-lactato desidrogenase (France *et al.*, 2016).

Uma falta de vias metabólicas indica uma necessidade maior de obter nutrientes derivados pelo hospedeiro, o que pode ser, na verdade, uma vantagem adaptativa e competitiva de *L. iners*, já que para que isso ocorra é necessária uma maior adesão à fibronectina humana e, logo, ao ter maior contato com o tecido, há um fortuito maior na hidrólise e extração de carboidratos da mucosa da vagina. Em resumo, as enzimas necessárias para converter glicose em piruvato e piruvato em L-lactato estão presentes, mas não são transformados em outros metabólitos (France *et al.*, 2016; Macklaim *et al.*, 2011).

Por não haver produção significativa de D-ácido láctico em casos de CST III, a razão L-ácido láctico/D-lático pode elevar o CD147, ou, Indutor de Metaloproteinase de Matriz Extracelular (EMMPRIN), que é uma proteína presente nas membranas humanas e fluido extracelular, o que, consecutivamente, pode levar a uma ativação da metaloproteinase-8 (MMP), enzima que está fortemente associada com a degradação da matriz extracelular (Beghini *et al.*, 2015; Witkin *et al.*, 2013).

Apesar de não haver uma conexão direta entre os níveis de D-ácido láctico e os níveis vaginais de EMMPRIN, a elevação de sua concentração em relação ao L-ácido láctico está associada à redução dos níveis do indutor. Quando não há presença de D-ácido láctico, os níveis de EMMPRIN aumentam, resultando em concentrações elevadas de MMP-8. Isso, por sua vez, facilita a migração de bactérias em direção à endocérvice e ao útero, aumentando a suscetibilidade a problemas durante a gravidez e infecções urogenitais (Witkin *et al.*, 2013). Em concordância com tais observações, recente trabalho *in vitro* observou que espécie de lactobacilo produtora de D e L-ácido láctico é mais eficaz em diminuir a infectividade bacteriana de *Chlamydia trachomatis* em células HeLa, quando comparados a lactobacilos produtores apenas de L-ácido láctico, como o *L. iners* (Zalambani *et al.*, 2023)

2.1.6.5 Controvérsias sobre o papel protetor do *Lactobacillus iners*

Atualmente, um dos métodos mais utilizados para o diagnóstico de vaginose bacteriana (VB) é o chamado Escore de Nugent. Utilizando-se da coloração de Gram de amostras do conteúdo vaginal em esfregaço em lâmina e da análise de morfotipos, forma-se uma escala de 0 a 10, na qual, de 0 a 4 considera-se uma microbiota normal e, de 7 a 10, uma VB (Nugent; Krohn; Hillier, 1999). Interessante destacar que características clínicas e epidemiológicas de mulheres com a CST III, dominada pelo *L. iners*, tem sido semelhante às observadas em casos de vaginose, o que suscita a discussão sobre o real papel protetivo dessa espécie lactobacilar.

Nesse contexto, a microbiota dominada por *L. iners* também pode ser mais propensa a abrigar espécies fúngicas, como a mais frequente na região vulvovaginal, a *Candida albicans*, embora existam resultados conflitantes. No estudo de Brown *et al.* (2023) entre amostras sem *C. albicans* detectadas, CST III (dominado por *L. iners*) foi o tipo mais abundante, seguido pelo CST IV (baixo teor de *Lactobacillus*). Tais inconsistências advém da instabilidade da microbiota da CST III, e essas flutuações podem resultar de fatores endógenos ou pressões exógenas (ou seja, alterações hormonais devido ao ciclo menstrual ou contracepção, sexo, práticas intravaginais) que servem para abrir nichos ecológicos e oportunizar outras espécies ou patógenos se expandirem ou invadirem a comunidade (Munoz *et al.*, 2021).

Dessa forma, novos estudos sobre a relação do *L. iners* com características pessoais e da microbiota de populações específicas são importantes para o entendimento da eubiose vaginal e para estímulo para o desenvolvimento de novos probióticos para a saúde da mulher.

2.1.6.6 A técnica de PCR

Na primavera de 1984, em um evento anual empreendido pela Cetus Corporation, um poster fora apresentado por Kary B. Mullis, poster esse que naquele momento acabou por não receber grande atenção e interesse por parte dos transientes, mas que, quarenta anos depois, reconhece-se como uma transformação irrevogável na biotecnologia. Trata-se da descoberta da chamada *Polymerase Chain Reaction* (PCR), técnica de aplicação relativamente simples que permite a cópia quase que ilimitada de fragmentos de DNA (Mullis, 1990).

Em resumo, o método consiste, segundo descrito por Mullis *et al.* (1986) e Saiki *et al.* (1988), em repetidos ciclos dos seguintes:

- a) Desnaturação: desnatura-se as fitas duplas de DNA (dsDNA) por meio do calor, que é responsável pela quebra unicamente das ligações de hidrogênio entre os pares de base, assim formando-se fitas simples desnaturadas (ssDNA) (*Royal Society of Chemistry*, 2014).
- b) Anelamento: há a hibridização dos primers específicos, ou seja, pequenos fragmentos de DNA iniciadores (*forward* e *reverse*) para a sequência de interesse em cada uma das ssDNA complementares.
- c) Polimerização: por meio da DNA-polimerase, há a síntese de novas dsDNA. Inicialmente utilizava-se um fragmento do DNA da *Escherichia coli* como fonte de DNA-polimerase, porém, nos dias atuais, prefere-se o uso da enzima da *Thermus aquaticus* (*Taq*), que é termoestável ao processo.
- d) Repetição dos ciclos: os ciclos podem em seguida ser repetidos, a fim de gerar, exponencialmente, um aumento da quantidade de fitas, o que permite a análise posterior do material.

Dessa forma, é possível aplicar a referida técnica para a busca de material genético específico, incluindo a pesquisa do DNA bacteriano das espécies de *Lactobacillus*, o que pode ajudar a compreender a distribuição das espécies na população estudada, e sua relação com outros patógenos, como a *Candida*, no conteúdo vaginal.

2.1.7 Metodologia

2.1.7.1 Tipo de Estudo

Trata-se um estudo do tipo observacional, transversal, quantitativo, sendo os objetivos da pesquisa uma análise descritiva e analítica.

2.1.7.2 Local e Período de Realização

Será realizado no intervalo entre março e dezembro de 2024 no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, localizados junto à Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), em Passo Fundo, no Rio Grande do Sul.

2.1.7.3 População e Amostragem

O estudo é um recorte do projeto maior de nome “Citologia cérvico-vaginal em meio líquido e detecção de Papiloma Vírus Humano (HPV), infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) e alteração da microbiota vaginal em mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde”, que teve a coleta de dados iniciada em 2020 e perpassa até o presente momento. Para o estudo, serão selecionadas as mulheres dentro da amostra em idade reprodutiva, não gestantes e não menopausadas, que foram atendidas pelo ambulatório e tiveram coleta de citologia cérvico-vaginal.

Para os critérios de exclusão definiu-se que não participarão mulheres que usaram antibióticos nos últimos 40 dias e que realizaram atividade sexual nas 72 horas anteriores à coleta, além das quais as amostras não se apresentem adequadas para posterior estudo molecular e citológico. Sabendo desses fatores, estima-se um tamanho da amostra em 200 pacientes, número originado pelas coletas feitas até o momento e pelo fluxo do serviço.

2.1.7.4 Variáveis, Instrumentos e Coleta de Dados

Os dados de coleta, tanto dos questionários, como de material biológico, são providos do projeto original, junto às pacientes que se apresentaram para consultas no Ambulatório de Ginecologia da Universidade Da Fronteira Sul (UFFS), no Campus de Passo Fundo, no Rio Grande do Sul, que realizaram o exame de Papanicolau e concordaram em participar do estudo.

Serão utilizadas, para a análise estatística posterior, as seguintes variáveis, obtidas como parte do formulário, disponível no Anexo 01: idade (em anos completos), raça/cor, situação conjugal, se sexualmente ativa, renda, se histórico autorreferido de algum tipo de infecção sexual, dados do exame clínico e de queixas (queixas de leucorreia, odor, dor, amenorreia, dispareunia, prurido, vulvite, endocervicite, ectopia, lesão e outros), resultado de exames clínicos (Whiff test e Teste de pH vaginal).

Também serão utilizadas como variáveis, obtidas por meio do estudo laboratorial realizado na pesquisa, a presença de *Candida* spp., a presença e/ou ausência e/ou predomínio de tipos de *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* e *L. iners*). Pode-se conferir de forma mais detalhada a classificação sobre dependência e independência das variáveis na seção 2.1.7.5.

2.1.7.4.1 Momento da consulta, coleta e da técnica citológica empregada:

As pacientes são submetidas ao afastamento das paredes vaginais (utilizando-se do Espéculo Vaginal Collin esterilizado e sem lubrificantes). Em seguida, há a aferição do pH vaginal, fazendo o uso de fitas comerciais de aferição de pH, que são posicionadas no terço médio da vagina. Em seguida, é coletado o *Swab* dessa mesma porção, sendo disposto o conteúdo em lâminas para coloração de Gram em duas unidades.

O Whiff Test é realizado, por meio da adição de KOH (10%) ao conteúdo coletado. Em seguida, são coletadas as amostras cérvico-vaginais pela citologia em meio líquido, onde, com o uso de espátula especial e da escova endocervical, há a raspagem e coleta de células do epitélio da ectocervice e endocervice, respectivamente que são dispostos, ao contrário da citologia convencional, em um líquido preservador, no caso, o CellPreserver® (Kolplast), e feita agitação manual do frasco. A amostragem é enviada para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS para posteriores análises e testes.

2.1.7.4.2 Protocolos para a análise laboratorial do conteúdo

Para a extração de DNA o seguinte protocolo será seguido: 1mL é retirado da coleta em meio líquido e separado em microtubos. Conforme instruções do fabricante, o volume é submetido à centrifugação e coleta do *pellet* celular com subsequente extração de DNA total utilizando-se os reagentes comerciais de purificação (*Illustra DNA tissue and cell genomicPrep*, GE Healthcare). As amostras são armazenadas a uma temperatura de -20°C até sua utilização na detecção e genotipagem do DNA dos lactobacilos em questão através da técnica de PCR. A concentração do DNA de cada amostra será estimada através do equipamento de espectrofotômetro.

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) será realizada conforme explicitada por Yeruva, Rajkumar e Donugama (2017), através da qual cada amostra inicialmente será amplificada e identificada, em um primeiro momento, à nível de gênero *Lactobacillus*, utilizando o *forward primer* (F) CTCAAAACTAAACAAAGTTTC-F e *reverse primer* (R) CTTGTACACACCGCCCGTTCA-R. A desnaturação inicial das fitas será feita em uma temperatura de 94°C, por cinco minutos; consecutivamente, realizar-se-á 30 ciclos de desnaturação (94°C, 30 segundos), anelamento do DNA (56°C, 5 minutos) e extensão (72°C),

no aparelho de termociclador. As reações serão realizadas em volume final de 20 uL, composto de 10 uL de PCR Buffer 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega); 1,0 de cada primer na concentração de 10 uM; água estéril q.s.p. e 2 uL de cada amostra pesquisada. Como controle negativo há a presença de água estéril, e, como controle positivo, o DNA extraído de material previamente identificado para o gênero bacteriano de interesse.

O produto do protocolo será colocado em eletroforese por gel em agarose 1,5%, preparada em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA), corada com Brometo de Etídio, seguido a uma comparação dos tamanhos dos produtos com o padrão de 50 pares de base e fotografia sob transiluminação ultra-violeta (UV).

Em seguida, as amostras positivas para *Lactobacillus* spp. serão submetidas a novas reações específicas de PCR, utilizando-se primers específicos para as espécies de *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* e *L. iners*. Os primers utilizados (5´-3´) podem ser observados na Tabela 01:

Tabela 01 – Sequências de primers para a identificação de espécies de *Lactobacillus* pela técnica de PCR.

Nome da Espécie	Sequência Primer (5´-3´)	Tamanho do Produto (bp)
<i>Lactobacillus crispatus</i>	AGGATATGGAGAGCAGGAAT-F	522
	CAACTATCTCTTACTGACC-R	
<i>Lactobacillus jensenii</i>	AAGAAGGCACTGAGTACGGA-F	700
	CCTTCCCTCACGGTACTG-R	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	AGCGACCGAGAAGAGAGAGA-F	360
	TGCTATCGCTTCAAGTGCTT-R	
<i>Lactobacillus iners</i>	GTCTGCCTTGAAGATCGG-F	158
	ACAGTTGATAGGCATCATC-R	

Fonte: Adaptado de Yeruva, Rajkumar e Donugama (2017, p. 536)

Todos os primers foram testados para compatibilidade na plataforma *online* de bioinformática BLAST®, da National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information, atingindo uma identidade de 100% em todos os casos.

Para a identificação das amostras com presença de *Candida* spp. optou-se pela identificação citopatológica microscópica, em coloração de Gram, buscando-se *budding cells* (células em brotamento), hifas e pseudo-hifas e tubos germinativos.

2.1.7.5 Processamento, Controle de Qualidade e Análise dos Dados

Os resultados advindos das informações de prontuários, moleculares e citopatológicas serão duplamente digitados no software EpiData (distribuição livre) e seguirão para análise estatística a ser realizada nos softwares, também de distribuição livre, PSPP e R. Essa análise será feita em três tempos, sendo os seguintes:

- 1) Utilização do teste de Chi-quadrado de Pearson (X^2) para observação da significância da relação entre variáveis independentes idade (em anos completos), raça/cor, situação conjugal, se sexualmente ativa e renda e dependentes, no caso, a presença ou ausência dos lactobacilos *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* e *L. iners*.
- 2) Utilização do teste de Chi-quadrado de Pearson (X^2) para observação da significância da relação entre a variável independente *predomínio de L. iners* e o desfecho relacionado às queixas clínicas, sendo elas leucorreia, odor, dor, amenorreia, dispareunia e prurido, do exame clínico (leucorreia, odor, vulvite, endocervicite, ectopia ou lesões) e dos testes clínicos (Whiff test e Teste de pH vaginal).
- 3) Utilização do teste de Chi-quadrado de Pearson (X^2) para observação da significância da relação entre a variável independente *predomínio de L. iners* e o desfecho, que é a presença de *Candida* spp. na amostra.

Será aplicado uma significância de 5%. Também serão feitas as distribuições simples de frequências.

2.1.7.6 Aspectos Éticos

O projeto maior foi aprovado com os pareceres 3.736.932, 4.541.838 e 6.578.539, presentes no Anexo 02, em conformidade com a Resolução 466/2021 do Conselho Nacional de Saúde.

As mulheres participantes da pesquisa tomaram informação e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.1.7.7 Recurso

Para a realização do estudo, prevê-se a utilização dos seguintes recursos, apresentados no Quadro 01.

Quadro 01 – Recursos Utilizados

Itens	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Custo Total (R\$)
Folhas de Papel A4 (impressões)	300 unidades	0,20	60,00
PCR	300 unidades	18,00	5.400,00
Materiais para Coloração de Gram	300 lâminas	1,50	450,00
Total			5.910,00

Fonte: o autor, 2023.

O custeio das despesas será feito por recursos provindos do edital n. 459/GR/UFGS/2019 “fomento à pesquisa com ênfase no fortalecimento dos programas de pós-graduação *stricto sensu* da UFGS”. Os equipamentos utilizados para a análise molecular e citológica pertencem à própria Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo.

2.1.7.8 Cronograma

Realização do Estudo: 04/03/2024 a 30/11/2024.

Revisão de Literatura: 04/03/2024 a 31/10/2024.

Coleta dos Dados e Processamento Laboratorial: 04/03/2024 a 13/07/2024.

Análise Estatística dos Dados Obtidos: 05/08/2024 a 20/09/2024.

Escrita e Divulgação dos Resultados: 20/09/2024 a 30/11/2024.

REFERÊNCIAS

- BEGHINI, J. *et al.* Differential expression of lactic acid isomers, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and matrix metalloproteinase-8 in vaginal fluid from women with vaginal disorders. **Bjog: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [S.L.], v. 122, n. 12, p. 1580-1585, 8 set. 2014.
- BROTMAN, R. M. *et al.* Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection. **Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 210, n. 11, p. 1723-1733, 18 jun. 2014.
- CAMUS, Albert. **O Mito de Sísifo**. 26. ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Record, 2018.
- CHEE, W. J. Y.; CHEW, S. Y.; THAN, L. T. L. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 19, n. 1, 7 nov. 2020.
- CHEN, X. *et al.* The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 11, 7 abr. 2021.
- COSTELLO, E. K. *et al.* Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. **Science**, [S.L.], v. 326, n. 5960, p. 1694-1697, 18 dez. 2009.
- FALAGAS, M. E.; BETSI, G.I.; ATHANASIOU, S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 657-664, jul. 2007.
- FALSEN, E. *et al.* Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel Lactobacillus species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. L.], v. 49, p. 217-221, 1999.
- FRANCE, M. T.; MENDES-SOARES, H.; FORNEY, L. J.. Genomic Comparisons of Lactobacillus crispatus and Lactobacillus iners Reveal Potential Ecological Drivers of Community Composition in the Vagina. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 82, n. 24, p. 7063-7073, 15 dez. 2016.
- KIM, H. *et al.* Is Lactobacillus Gram-Positive? A Case Study of Lactobacillus iners. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 969-976, 29 jun. 2020.
- KINDINGER, L. M. *et al.* The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. **Microbiome**, [S.L.], v. 5, n. 1, 19 jan. 2017.
- KLEBANOFF, J. J. *et al.* Control of the Microbial Flora of the Vagina by H₂O₂-Generating Lactobacilli. **The Journal Of Infectious Diseases**, Washington, v. 164, p. 94-100, mar. 1991.
- MACKLAIM, J. M. *et al.* At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of Lactobacillus iners AB-1. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 1, p. 4688-4695, 8 nov. 2010.
- MADHIVANAN, P. *et al.* Identification of culturable vaginal Lactobacillus species among reproductive age women in Mysore, India. **Journal Of Medical Microbiology**, [S.L.], v. 64, n. 6, p. 636-641, 1 jun. 2015.

- MARCONI, C. *et al.* Characterization of the Vaginal Microbiome in Women of Reproductive Age From 5 Regions in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**, [S.L.], v. 47, n. 8, p. 562-569, 10 jun. 2020.
- MEI, Z.; LI, D. The role of probiotics in vaginal health. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 12, 28 jul. 2022.
- MORRIS, J. J.; LENSKI, R. E.; ZINSER, E. R.. The Black Queen Hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. **Mbio**, Michigan, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2 maio 2012.
- MUNOZ, A. *et al.* Modeling the temporal dynamics of cervicovaginal microbiota identifies targets that may promote reproductive health. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 163, 2021.
- MULLIS, K. B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**, [S.L.], v. 262, n. 4, p. 56-65, abr. 1990.
- MULLIS, K. B. *et al.* Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology**, [S.L.], v. 51, p. 263-273, 1 jan. 1986
- NORENHAG, J. *et al.* The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis. **Bjog: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [S.L.], v. 127, n. 2, p. 171-180, 17 jul. 2019.
- NOVAK, J. *et al.* Characteristics associated with Lactobacillus iners-dominated vaginal microbiota. **Sexually Transmitted Infections**, [S.L.], v. 98, n. 5, p. 353-359, 8 set. 2021.
- NUGENT, R. P.; KROHN, A. M.; HILLIER, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **Journal Of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 2, p. 297-301, fev. 1991.
- O'HANLON, D E. *et al.* Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-8, 19 maio 2010.
- O'HANLON, D E. MOENCH, T. R.; CONE, R. A. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-8, 19 jul. 2011.
- PETROVA, M. I. *et al.* Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 6, 25 mar. 2015.
- RAVEL, J. *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 1, p. 4680-4687, 2011.
- ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. PCR – the polymerase chain reaction. **Analytical Methods**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 333-336, 2014.
- SAIKI, R. K. *et al.* Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, [S. L.], v. 239, n. 4839, p. 487-491, 29 jan. 1988.
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet**, [S.L.], v. 369, n. 9577, p. 1961-1971, jun. 2007.

VANEECHOUTTE, M. *Lactobacillus iners*, the unusual suspect. **Research In Microbiology**, [S.L.], v. 168, n. 9-10, p. 826-836, nov. 2017.

YERUVA, T.; RAJKUMAR H.; DONUGAMA V. Vaginal lactobacilli in pregnant women with normal & abnormal vaginal flora. **Indian Journal of Medical Research**. [S.L.], v.146, p. 534-540, out. 2017.

WANG, S. *et al.* Antimicrobial Compounds Produced by Vaginal *Lactobacillus crispatus* Are Able to Strongly Inhibit *Candida albicans* Growth, Hyphal Formation and Regulate Virulence-related Gene Expressions. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 08, 4 abr. 2017.

WIJGERT, J. H. H. M. van de *et al.* The Vaginal Microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization?. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 8, 22 ago. 2014.

WITKIN, S. S. *et al.* Influence of Vaginal Bacteria and d - and l -Lactic Acid Isomers on Vaginal Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer: implications for protection against upper genital tract infections. **Mbio**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 1-8, 30 ago. 2013.

ZALAMBANI, C., *et al.* Role of D(-)-Lactic Acid in Prevention of *Chlamydia trachomatis* Infection in an In Vitro Model of HeLa Cells. **Pathogens**. Basel, Suíça, 12(7), 883, 2023.

ZHENG, N. *et al.* Contribution of *Lactobacillus iners* to Vaginal Health and Diseases: a systematic review. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 11, 22 nov. 2021.

ANEXO 01 – Questionário aplicado às pacientes

Citologia cérvico-vaginal em meio líquido e detecção de Papiloma Vírus Humano (HPV), infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) e alteração de microbiota vaginal em mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde

Instrumento: Questionário a ser aplicado via entrevista direta com as pacientes na consulta.

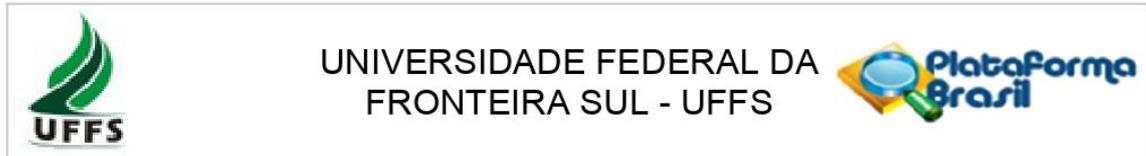
QUESTOES DE IDENTIFICAÇÃO E SOCIODEMOGRAFICAS	
	NQUES ____
Nome do entrevistador	
Data	
Qual é o seu nome completo?	
Você tem telefone para contato? <i>SE NAO, PERGUNTE SOBRE TELEFONE PARA RECADO E ANOTE DE QUEM É</i>	
Qual é a sua idade? ____ ANOS COMPLETOS	IDADE ____
Você se considera de que raça/cor? (1) Branca (2) Preta (3) Parda (4) Indígena (5) Amarela	RACA ____
Você sabe ler e escrever? (0) Não (1) Só assina o nome (2) Sim. Quantos anos de estudo, completos e com aprovação, você tem? ____ anos	LER ____ ESCOLA ____
Em relação à situação conjugal, você: (0) Não tem companheiro (1) Tem companheiro. Há quanto tempo está com o companheiro atual? _____ (EM MESES)	COMPAN ____ TEMPCO ____
No total, quantas pessoas, incluindo você, moram na sua casa? ____	MORA ____
Você exerce atividade remunerada? (0) Não/Aposentado/Pensionista (1) Sim/Em benefício. Trabalha em quê? _____	TRAB ____ TIPOT ____
Qual a renda total das pessoas que moram na sua casa, incluindo você?	RENDA _____
Qual sua religião? _____ (0) não tem	RELI ____
Você mora em Passo Fundo? (1) Sim. Qual o bairro? _____ (2) Não. Qual cidade? _____	RESID ____ BAIRRO ____ CIDADE ____
QUESTOES SOBRE HABITOS DE VIDA E DE SAUDE	
Você sabe seu peso? _____ Kg (0) Não sei	PESO ____
Você sabe sua altura? _____ metros (0) Não sei	ALTURA __, __
Você fuma? (1) Sim (2) Não/ex-fumante	FUMA ____
Você tem o costume de consumir bebida alcoólica? <i>AS VEZES/DE VEZ EM QUANDO, CONSIDERE "SIM"</i> (1) Sim (2) Não	BEBE ____
Qual foi a idade da sua primeira menstruação? _____ (00) não lembra	IDMENST ____
Qual foi a idade da sua primeira relação sexual? _____ (00) não lembra	IDSEX ____
Você é sexualmente ativo? (0) Não (1) Sim. Quantos parceiros sexuais você teve nos últimos 12 meses? _____ Você tem o hábito de usar preservativo/camisinha? (1) Sim, sempre (2) Sim, algumas vezes (3) Não. Você usa algum método para evitar a gravidez? (0) Não (1) Sim. Qual? _____	ATIVO ____ PARCE ____ PRESERVA ____ CONTRA ____

<p>Alguma vez na vida você fez exame ginecológico preventivo? (0) Não. Por que você não fez o exame ginecológico preventivo? _____</p> <p>(1) Sim Quando fez seu último exame ginecológico preventivo? <i>HÁ</i> _____ <i>MESES</i> (00) mais de 3 anos Qual foi o resultado do seu último exame ginecológico preventivo? (1) Normal (2) Alterado (3) infecção (4) nunca fez/não lembra</p>	PREV____ PQNPREV____ DATAPREV__ __ ULTPREV__
<p>Você já engravidou? (1) Sim Quantas vezes ficou grávida? __ __ Qual foi a idade da primeira gravidez? __ __ anos Você tem filhos? (0) Não. (1) Sim. Quantos? __ __ filhos Você fez parto normal? (0) Não (1) Sim. Quantos? __ __ Você fez parto cesáreo? (0) Não (1) Sim. Quantos? __ __ Teve alguma complicação nas gestações anteriores? (0) Não (1) Sim. Qual _____</p> <p>(2) Não Já tentou engravidar e não conseguiu? (0) Não (1) Sim. Por quanto tempo tentou? _____ (EM MESES) Sabe por que não conseguiu engravidar? (0) Não (1) Sim. Por quê? _____</p>	GRAVIDA____ NGRAVI __ __ IGRAVI __ __ FILHO____ QFILHO__ __ NORMAL____ QNORM__ __ CESAR ____ QCESAR__ __ COMPLIC __ COMPANT __ CONS ____ QCONS __ __ SABE____ PQNCONS __
<p>Alguma vez algum médico lhe disse que você teve:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vaginose bacteriana? (1) Sim (2) Não/ Não sabe/não lembra • Candidíase? (1) Sim (2) Não/ Não sabe/não lembra • HPV – Papilomavirus Humano? (1) Sim (2) Não/ Não sabe/não lembra • Sífilis? (1) Sim (2) Não/ Não sabe/não lembra • Alguma outra infecção genital (1) Sim (2) Não/ Não sabe/não lembra <i>SE SIM, QUAL?</i> _____ • Diabetes? (1) Sim (2) Não/ Não sabe/não lembra • Pressão Alta (1) Sim (2) Não/ Não sabe/não lembra • Câncer? (1) Sim (2) Não/ Não sabe/não lembra • <i>SE SIM, em que local do corpo?</i> _____ 	VB____ CANDIDA____ HPV ____ SIFILIS____ OUTRAINFEC____ QUALINF __ __ DM ____ HAS ____ CANCER ____ LCAN __ __
<p>Você tomou a vacina para HPV? (1) Sim (2) Não. Por quê? _____</p>	VACIN____ PQNVAC ____
<p>Qual foi o dia da última relação com o parceiro? Há _____ dias</p> <p>Fez uso de antibiótico nos últimos 40 dias? (1) Sim (2) Não.</p>	ULTREL ____

EXAMES CLÍNICOS	
Queixas: Leucorréia ("corrimento"): (0) Não (1) Sim Tempo: (1) até 7 dias (2) 08-30 dias (3) + 30 dias (4) Não sabe Intensidade: (1) pouco (2) moderado (3) muito (4) Não sabe Aspecto: (1) fluido (2) pastoso (3) não sabe Cor: (1) branco (2) amarelo (3) esverdeado (4) não sabe Odor: (0) Não (1) Sim Dor: (0) Não (1) Sim Amenorréia: (1) Sim (2) Não Dispareunia: (1) Sim (2) Não Prurido (1) Sim (2) Não Outra queixa: (1) Sim (2) Não Qual? _____	QLEUCOR__ QTEMPO__ QINTEN__ QASPEC__ QCOR__ QODOR__ DOR__ AMEN__ DISPAR__ PRURIDO__ OUTRA__ QOUTRA__
Exame clínico: Leucorréia: (0) Não (1) Sim Intensidade: (1) pouco (2) moderado (3) muito (4) Não sabe Aspecto: (1) fluido (2) pastoso (3) não sabe Cor: (1) branco (2) amarelo (3) esverdeado (4) não sabe Odor (0) Não (1) Sim Vulvite (0) Não (1) Sim Endocervicite (0) Não (1) Sim Ectopia (0) Não (1) Sim Lesão (0) Não (1) Sim Outros _____	ELEUCOR__ EINTEN__ EASPEC__ ECOR__ EODOR__ EVULV__ ENDOC__ ECTO__ ELESO__ EOUTRO__
Exames clínicos: Whiff test: (1) positivo (2) negativo (3) não realizado Teste de Schiller/Teste com Lugol: (1) positivo (2) negativo (3) não realizado Teste pH vaginal: (1) 3,0 a 4,0 (2) 4,0 a 5,0 (3) >5,0 (4) não realizado	WHIFF__ LUGOL__ PH__
RESULTADOS DOS TESTES	
Exame citopatológico convencional (SUS-SISSCAN): _____	CITOSUS__
Exame citopatológico meio líquido: _____	CITOLIQ__
PCR para HPV: (1) positivo (2) negativo	HPV__
Tipagem de HPV: (1) 16 (2) 18 (3) 6/11 (4) outro	HPVTP__
PCR Tempo real: (1) positivo (2) negativo	RTHPV__
Tipagem de HPV tempo REAL: _____	RTIPO__
Exame da microbiota vaginal (Gram): Flora 1 (0) Não (1) Sim Flora 2 (0) Não (1) Sim Vaginose Bacteriana 7e 8 (0) Não (1) Sim Vaginose Bacteriana 9 e 10 (0) Não (1) Sim Candidíase (0) Não (1) Sim Vaginose citolítica (0) Não (1) Sim Vaginite aeróbia (0) Não (1) Sim Flora 1+PMN (0) Não (1) Sim Outro _____	FLORA1__ FLORA2__ VB78__ VB910__ CAND__ VC__ VA__ F1PMN__ OUTROG__
PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i> (1) positivo (2) negativo	CHLA__
TRATAMENTO	

Tratamento	
RETORNO	
<p>DATA DO RETORNO:</p> <p>Queixas:</p> <p>Leucorréia ("corrimento"): (0) Não (1) Sim Tempo: (1) até 7 dias (2) 08-30 dias (3) + 30 dias (4) Não sabe Intensidade: (1) pouco (2) moderado (3) muito (4) Não sabe Aspecto: (1) fluido (2) pastoso (3) não sabe Cor: (1) branco (2) amarelo (3) esverdeado (4) não sabe</p> <p>Odor: (0) Não (1) Sim Dor: (0) Não (1) Sim Amenorréia: (1) Sim (2) Não Dispareunia: (1) Sim (2) Não Prurido (1) Sim (2) Não Outra queixa: (1) Sim (2) Não Qual? _____</p> <p>Exame clínico:</p> <p>Leucorréia: (0) Não (1) Sim Intensidade: (1) pouco (2) moderado (3) muito (4) Não sabe Aspecto: (1) fluido (2) pastoso (3) não sabe Cor: (1) branco (2) amarelo (3) esverdeado (4) não sabe</p> <p>Odor (0) Não (1) Sim Vulvite (0) Não (1) Sim Endocervicite (0) Não (1) Sim Ectopia (0) Não (1) Sim Lesão (0) Não (1) Sim Outros _____</p> <p>Exames clínicos:</p> <p>Whiff test: (1) positivo (2) negativo (3) não realizado Teste de Schiller/Teste com Lugol: (1) positivo (2) negativo (3) não realizado Teste pH vaginal: (1) 3,0 a 4,0 (2) 4,0 a 5,0 (3) >5,0 (4) não realizado</p>	<p>DATAR ____/____/____</p> <p>QLEUCOR2__ QTEMPO2__ QINTEN2__ QASPEC2__ QCOR2__ QODOR2__ DOR2__ AMEN2__ DISPAR2__ PRURIDO2__ OUTRA2__ QOUTRA2__</p> <p>ELEUCOR2__ EINTEN2__ EASPEC2__ ECOR2__ EODOR2__ EVULV2__ ENDOC2__ ECTO2__ ELESO2__ EOUTRO2__</p> <p>WHIFF2__ LUGOL2__ PH2__</p>
<p>Exame da microbiota vaginal (Gram):</p> <p>Flora 1 (0) Não (1) Sim Flora 2 (0) Não (1) Sim Vaginose Bacteriana 7e 8 (0) Não (1) Sim Vaginose Bacteriana 9 e 10 (0) Não (1) Sim Candidíase (0) Não (1) Sim Vaginose citolítica (0) Não (1) Sim Vaginose aeróbia (0) Não (1) Sim Flora 1+PMN (0) Não (1) Sim Outro _____</p>	<p>FLORA12__ FLORA22__ VB782__ VB9102__ CAND2__ VC2__ VA2__ F1PMN2__ OUTROG2__</p>
TRATAMENTO 2	
Tratamento 2	

ANEXO 02 – Pareceres Consubstanciados do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Citologia cérvico-vaginal em meio líquido e diagnóstico molecular de Papiloma Vírus Humano (HPV) e infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) em mulheres em atendidas na Rede Básica de Saúde.

Pesquisador: GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17632919.0.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.736.932

Apresentação do Projeto:

O projeto trata de reapresentação de protocolo de pesquisa em que haviam permanecido pendências éticas de acordo com o parecer nº 3.501.252.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar a prevalência de alterações em exames citológicos de colo de útero, bem como sua relação com a infecção pelo Papiloma Vírus Humano

(HPV) e outras ISTs em mulheres em idade reprodutiva e implementar um método diagnóstico molecular para HPV acessível às mulheres atendidas

na Rede Básica de Saúde.

Objetivo Secundário:

Determinar a frequência de alterações patológicas em exames citológicos em mulheres em idade reprodutiva no município de Passo Fundo, RS.

Determinar os fatores sociais, demográficos e de saúde associados às pacientes com alterações citológicas.

Demonstrar a importância do meio

líquido na preservação de amostras celulares para testes adicionais com sensibilidade adequada para detecção de HPV e outras ISTs, como os

testes de PCR convencional e PCR em Tempo, uma vez que o Sistema Único de Saúde não

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

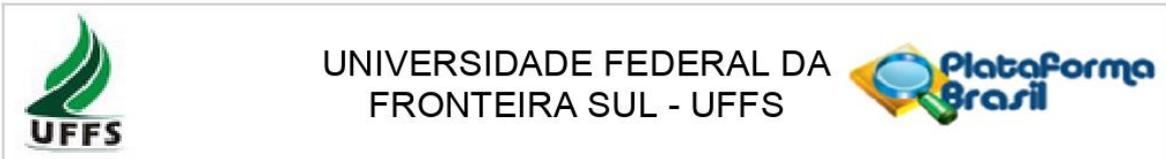
CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 3.736.932

disponibiliza estas técnicas para a população atendida dentro do sistema. Padronizar ensaios de PCR convencional e em Tempo Real com sensibilidade adequada para detecção de HPV em amostras provenientes de exame citológico em meio líquido e demonstrar que a detecção do material genético viral pode ser uma técnica acessível para triagem da população. Detectar o material genético viral dos sorotipos mais importantes do vírus: HPVs 16 e 18 (alto risco para câncer de colo de útero) e HPVs 6 e 11 (baixo risco) por PCR convencional e Tempo Real. Avaliar a correlação entre exames citopatológicos alterados e presença de HPV detectado por PCR convencional e Tempo Real. Detectar por método molecular (PCR) os microrganismos comumente associados à flora vaginal, assim como os potenciais patógenos associados a vaginose bacteriana isolados no exame citológico. Estimar a frequência dos diferentes sorotipos de HPV na população estudada. Identificar os fatores sociodemográficos e clínicos associados ao diagnóstico positivo de HPV e de exame citológico alterado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos deste projeto estão relacionados à coleta para o exame citológico, envolvendo possível desconforto, tontura, mal-estar e constrangimento.

Para minimizar estes riscos o procedimento de coleta será realizado por profissionais capacitados, em ambiente reservado e sem a presença de demais pessoas, permitindo a assistência necessária durante e após o procedimento. Se eventualmente os riscos se concretizarem, por exemplo, nos casos de desconforto, tonturas ou mal-estar a paciente será posicionada deitada em uma maca e será procedida a aferição de pressão arterial e acompanhamento até normalização, caso o mal-estar persista a paciente será encaminhada à assistência médica. Referente à aplicação do questionário, para evitar constrangimentos, estes serão executados por profissionais da área da saúde, sendo comunicado à paciente que esta poderá se abster de responder as perguntas. A entrevista será realizada em sala isolada, minimizando os riscos de constrangimento. Ademais, os riscos deste projeto envolvem a divulgação de dados de identificação das pacientes. Para

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

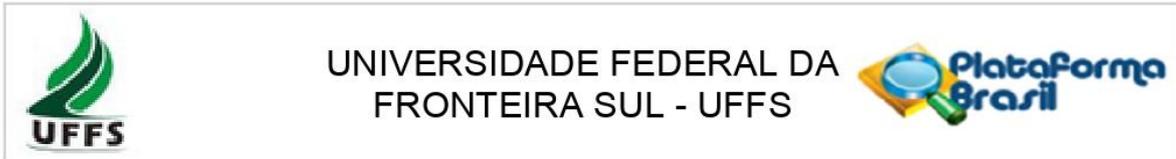
CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECÓ

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 3.736.932

minimizar os riscos de quebra de sigilo os nomes e números de documentos de identidade das pacientes não serão divulgados em nenhum documento. Nomes e variáveis referentes a cada paciente serão substituídos por números no momento da divulgação dos resultados da pesquisa, de forma a não divulgar qualquer informação referente à amostra, que possa identificar os participantes. O arquivo contendo a planilha geral com os dados será manipulado em um único computador de uso pessoal e de responsabilidade da equipe de pesquisa. No caso de os riscos se concretizarem o estudo será interrompido.

Benefícios:

Como benefícios podemos relatar que o diagnóstico específico de presença de HPV e o laudo do exame citológico é um importante exame preventivo de câncer de colo do útero. A paciente incluída no estudo será informada especificamente em relação ao exato vírus que a infecta, o que permitirá ao médico um melhor tratamento, aliviando de maneira mais eficiente os sintomas deste paciente. Ademais, a pesquisa trará como benefício indireto aos participantes, avaliar a frequência de exames citopatológicos alterados, bem como sua relação com as infecções pelo Papiloma Vírus Humano, com as neoplasias de colo uterino e sua distribuição no município de Passo Fundo, RS. Dessa forma, será possível planejar e executar medidas de promoção e prevenção de saúde que mudem a incidência e o prognóstico da doença, de modo que todas as pacientes possuam uma melhor qualidade de vida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores realizaram as adequações éticas, conforme apresentado em carta de pendências anexada na Plataforma Brasil, bem como realizaram as alterações nos espaços da PB.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto nova está adequada
 TCUDA está adequado
 TCLE novo está adequado
 Termo de Ciência da Instituição está adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural CEP: 89.815-899
UF: SC Município: CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 3.736.932

Não há impedimentos éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador(a)

A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa. Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997. A página do CEP/UFFS apresenta alguns pontos no documento “Deveres do Pesquisador”.

Lembre-se que:

1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Veja modelo na página do CEP/UFFS. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.
2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.
3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicização dos resultados. Veja modelo na página do CEP/UFFS.

Em caso de dúvida:

Contate o CEP/UFFS: (49) 2049-3745 (8:00 às 12:00 e 14:00 às 17:00) ou cep.uffs@uffs.edu.br;

Contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitando ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;

Contate a “central de suporte” da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.

Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural CEP: 89.815-899
UF: SC Município: CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 3.736.932

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1395936.pdf	27/11/2019 20:45:36		Aceito
Outros	termo_ciencia_hsvp.pdf	27/11/2019 20:45:13	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	TCUD.pdf	19/11/2019 16:16:29	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	carta_resposta.pdf	14/11/2019 15:20:25	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/11/2019 15:19:54	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_completo_novo.pdf	14/11/2019 15:19:36	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_nova.pdf	14/11/2019 15:18:53	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	ficha_rotina.pdf	10/07/2019 19:55:10	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	Instrumento_coleta.pdf	10/07/2019 19:54:45	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 30 de Novembro de 2019

Assinado por:
Fabiane de Andrade Leite
(Coordenador(a))

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Citologia cérvico-vaginal em meio líquido e diagnóstico molecular de Papiloma Vírus Humano (HPV) e infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) em mulheres em atendidas na Rede Básica de Saúde.

Pesquisador: GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 17632919.0.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.541.838

Apresentação do Projeto:

Trata de encaminhamento de emenda ao projeto de pesquisa em que o pesquisador justifica:

Solicito a inclusão de coletas no Ambulatório do SUS do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), mesma instituição ligada ao Ambulatório de Ginecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), no qual as coletas já estão em andamento. Justifica-se a emenda uma vez que houve diminuição do fluxo de pacientes devido a pandemia do Sars-CoV-2, a fim de aumentar o número de amostra (n) e atingir os objetivos propostos pelo estudo. Dessa forma, nenhuma abordagem adicional quanto à coleta de dados clínicos, citopatológicos ou mudança/adição de outros pontos na metodologia serão necessários. Além disso, solicito inclusão dos seguintes participantes: FABRÍCIO PERIN (CPF: 815.208.320.87) discente do Curso de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Fronteira Sul; MARIA EDUARDA LEMES MORA (CPF: 084.276.289-27), discente do Curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo Fundo; PATRÍCIA MARCOLIN (CPF: 029.580.890-02), discente do Curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo Fundo. Salienta-se que a autorização do local de coleta de dados já consta nos documentos enviados originalmente ao CEP (nome do arquivo: termo_ciencia_HSVP). As alterações estão destacadas em amarelo no projeto completo (arquivo: Projeto_Microbiota_Emenda) e nos respectivos campos da Plataforma Brasil

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

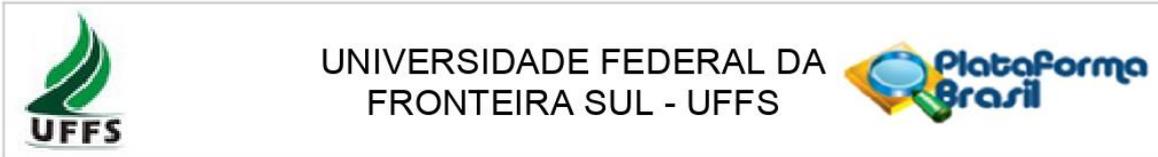
CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECÓ

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 4.541.838

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Determinar a prevalência de alterações em exames citológicos de colo de útero, bem como sua relação com a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) e outras ISTs em mulheres em idade reprodutiva e implementar um método diagnóstico molecular para HPV acessível às mulheres atendidas na Rede Básica de Saúde. **Objetivo Secundário:** Determinar a frequência de alterações patológicas em exames citológicos em mulheres em idade reprodutiva no município de Passo Fundo, RS. Determinar os fatores sociais, demográficos e de saúde associados às pacientes com alterações citológicas. Demonstrar a importância do meio líquido na preservação de amostras celulares para testes adicionais com sensibilidade adequada para detecção de HPV e outras ISTs, como testes de PCR convencional e PCR em Tempo Real, uma vez que o Sistema Único de Saúde não disponibiliza estas técnicas para a população atendida dentro do sistema. Padronizar ensaios de PCR convencional e em Tempo Real com sensibilidade adequada para detecção de HPV em amostras provenientes de exame citológico em meio líquido e demonstrar que a detecção do material genético viral pode ser uma técnica acessível para triagem da população. Detectar o material genético viral dos sorotipos mais importantes do vírus: HPV 16 e 18 (alto risco para câncer de colo de útero) e HPV 6 e 11 (baixo risco) por PCR convencional e Tempo Real. Avaliar a correlação entre exames citopatológicos alterados e presença de HPV detectado por PCR convencional e Tempo Real. Detectar por método molecular (PCR) os microrganismos comumente associados à floravaginal, assim como os potenciais patógenos associados a vaginose bacteriana isolados no exame citológico. Estimar a frequência dos diferentes sorotipos de HPV na população estudada. Identificar os fatores sociodemográficos e clínicos associados ao diagnóstico positivo de HPV e de exame citológico alterado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos deste projeto estão relacionados à coleta para o exame citológico, envolvendo possível desconforto, tontura, mal-estar e constrangimento. Para minimizar estes riscos o procedimento de coleta será realizado por profissionais capacitados, em ambiente reservado e sem a presença de demais pessoas, permitindo a assistência necessária durante e após o procedimento. Se eventualmente os riscos se concretizarem, por exemplo, nos casos de desconforto, tonturas ou mal-estar a paciente será posicionada deitada em uma maca e será procedida a aferição de pressão arterial e acompanhamento até normalização, caso o mal-estar persista a paciente será encaminhada à assistência médica. Referente à aplicação do questionário, para evitar constrangimentos, estes serão executados por profissionais da área da saúde, sendo comunicado à paciente que esta poderá se abster de responder as perguntas. A entrevista será

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

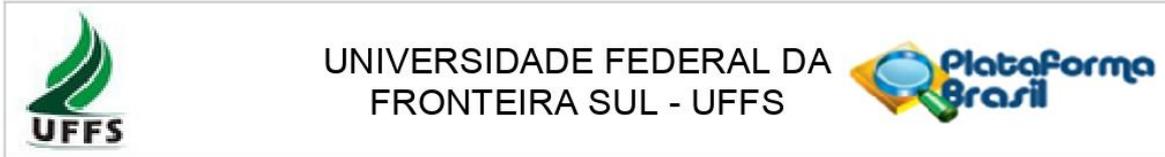
CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 4.541.838

realizada em sala isolada, minimizando os riscos de constrangimento. Ademais, os riscos deste projeto envolvem a divulgação de dados de identificação das pacientes. Para minimizar os riscos de quebra de sigilo os nomes e números de documentos de identidade das pacientes não serão divulgados em nenhum documento. Nomes e variáveis referentes a cada paciente serão substituídos por números no momento da divulgação dos resultados da pesquisa, de forma a não divulgar qualquer informação referente à amostra, que possa identificar os participantes. O arquivo contendo a planilha geral com os dados será manipulado em um único computador de uso pessoal e de responsabilidade da equipe de pesquisa. No caso de os riscos se concretizarem o estudo será interrompido. Benefícios: Como benefícios podemos relatar que o diagnóstico específico de presença de HPV e o laudo do exame citológico é um importante exame preventivo de câncer de colo do útero. A paciente incluída no estudo será informada especificamente em relação ao exato vírus que a infecta, o que permitirá ao médico um melhor tratamento, aliviando de maneira mais eficiente os sintomas deste paciente. Ademais, a pesquisa trará como benefício indireto aos participantes, avaliar a frequência de exames citopatológicos alterados, bem como sua relação com as infecções pelo Papiloma Vírus Humano, com as neoplasias de colo uterino e sua distribuição no município de Passo Fundo, RS. Dessa forma, será possível planejar e executar medidas de promoção e prevenção de saúde que mudem a incidência e o prognóstico da doença, de modo que todas as pacientes possuam uma melhor qualidade de vida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador justifica a necessidade de incluir coletas de dados no Ambulatório do SUS do HSVP considerando a reduzida participação no período da pandemia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda está aprovada

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador(a)

A emenda está aprovada.

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa. Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997. A página do CEP/UFFS apresenta alguns pontos no documento "Deveres do Pesquisador".

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECÓ

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 4.541.838

Lembre-se que:

1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Veja modelo na página do CEP/UFFS. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.
2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.
3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicização dos resultados. Veja modelo na página do CEP/UFFS.

Em caso de dúvida:

Contate o CEP/UFFS: (49) 2049-3745 (8:00 às 12:00 e 14:00 às 17:00) ou cep.uffs@uffs.edu.br;

Contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitando ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;

Contate a “central de suporte” da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.

Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_170265_1_E1.pdf	12/02/2021 16:30:29		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Microbiota_Emenda.docx	12/02/2021 16:29:28	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	termo_ciencia_hsvp.pdf	27/11/2019 20:45:13	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	TCUD.pdf	19/11/2019 16:16:29	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	carta_resposta.pdf	14/11/2019 15:20:25	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

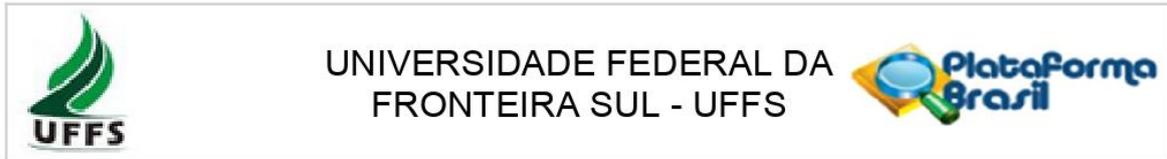
CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 4.541.838

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/11/2019 15:19:54	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_completo_novo.pdf	14/11/2019 15:19:36	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_nova.pdf	14/11/2019 15:18:53	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	ficha_rotina.pdf	10/07/2019 19:55:10	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	Instrumento_coleta.pdf	10/07/2019 19:54:45	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 15 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
Fabiane de Andrade Leite
(Coordenador(a))

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Citologia cérvico-vaginal em meio líquido e diagnóstico molecular de Papiloma Vírus Humano (HPV) e infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) em mulheres em atendidas na Rede Básica de Saúde.

Pesquisador: GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 17632919.0.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.578.539

Apresentação do Projeto:

Trata-se de submissão de emenda ao protocolo de pesquisa intitulado "Citologia cérvico-vaginal em meio líquido e diagnóstico molecular de Papiloma Vírus Humano (HPV) e infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) em mulheres em atendidas na Rede Básica de Saúde." para o qual o pesquisador responsável encaminhou a seguinte justificativa de emenda:

"Prezado(a) Coordenador(a), Solicito emenda ao projeto supracitado, a qual propõe a ampliação do período de recrutamento de participantes, entrevistas e coleta de material biológico para até novembro de 2025, prazo anteriormente previsto para ser executado até novembro de 2021. A justificativa é de que o n proposto não foi atingido, devido ao período pandêmico. Dessa forma, nenhuma abordagem adicional quanto à coleta de dados clínicos ou coleta adicional de material biológico serão necessárias. As alterações são detalhadas abaixo, assim como na versão com as referidas alterações destacadas em amarelo (arquivo: Projeto_Microbiota_emenda_2) e nos respectivos campos da Plataforma Brasil. 1. Listar cada uma das solicitações e a respectiva justificativa. 1.1. Inclusão de pesquisador: GIOVANA PAULA BONFANTTI DONATO (CPF: 468.280.100-78). Justificativa: A docente é uma das responsáveis pelo Ambulatório de Ginecologia e participará da coleta das amostras a serem incluídas no projeto. 1.2. Alteração do texto no campo "Desenho": Local e período: O estudo será realizado na cidade de Passo Fundo, RS,

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 6.578.539

entre 01 de dezembro de 2019 e 30 de dezembro de 2025. 1.3. Resumo: alteração do período de execução do estudo. 1.4. Bibliografia na introdução: não alterada 1.4. Tema/problemas/Hipótese e objetivos: não alterados 1.5. Campo "Metodologia Proposta": não alterados 1.6. Metodologia de análise de dados: não alterada 1.7. Cronograma de execução: Devido à proposição de ampliação do período de coleta, propõe-se um novo cronograma de desenvolvimento do projeto: Análise dos dados 01/05/2020 até 01/10/2025 Exames de laboratório 01/04/2020 até 01/05/2025 Inclusão de pacientes, aplicação de questionários e coleta de material biológico 01/03/2020 até 01/10/2025 Relatório final para o CEP 01/12/2025"

Objetivo da Pesquisa:

Transcrição dos objetivos:

"Objetivo Primário:

Determinar a prevalência de alterações em exames citológicos de colo de útero, bem como sua relação com a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) e outras ISTs em mulheres em idade reprodutiva e implementar um método diagnóstico molecular para HPV acessível às mulheres atendidas na Rede Básica de Saúde.

Objetivo Secundário:

Determinar a frequência de alterações patológicas em exames citológicos em mulheres em idade reprodutiva no município de Passo Fundo, RS.

Determinar os fatores sociais, demográficos e de saúde associados às pacientes com alterações citológicas. Demonstrar a importância do meio

líquido na preservação de amostras celulares para testes adicionais com sensibilidade adequada para detecção de HPV e outras ISTs, como os

testes de PCR convencional e PCR em Tempo, uma vez que o Sistema Único de Saúde não disponibiliza estas técnicas para a população atendida

dentro do sistema. Padronizar ensaios de PCR convencional e em Tempo Real com sensibilidade adequada para detecção de HPV em amostras

provenientes de exame citológico em meio líquido e demonstrar que a detecção do material genético viral pode ser uma técnica acessível para

triagem da população. Detectar o material genético viral dos sorotipos mais importantes do vírus: HPVs 16 e 18 (alto risco para câncer de colo de

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

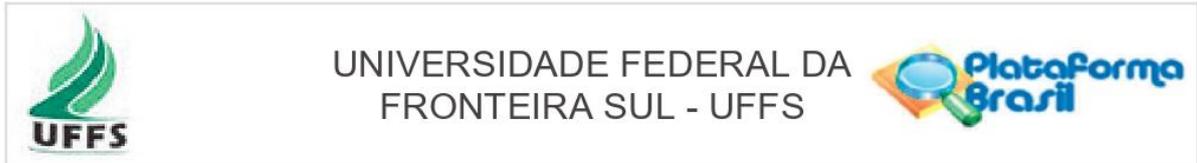
CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 6.578.539

útero) e HPVs 6 e 11 (baixo risco) por PCR convencional e Tempo Real. Avaliar a correlação entre exames citopatológicos alterados e presença de HPV detectado por PCR convencional e Tempo Real. Detectar por método molecular (PCR) os microrganismos comumente associados à flora vaginal, assim como os potenciais patógenos associados a vaginose bacteriana isolados no exame citológico. Estimar a frequência dos diferentes sorotipos de HPV na população estudada. Identificar os fatores sociodemográficos e clínicos associados ao diagnóstico positivo de HPV e de exame citológico alterado."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Transcrição dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

Os riscos deste projeto estão relacionados à coleta para o exame citológico, envolvendo possível desconforto, tontura, mal-estar e constrangimento.

Para minimizar estes riscos o procedimento de coleta será realizado por profissionais capacitados, em ambiente reservado e sem a presença de

demais pessoas, permitindo a assistência necessária durante e após o procedimento. Se eventualmente os riscos se concretizarem, por exemplo,

nos casos de desconforto, tonturas ou mal-estar a paciente será posicionada deitada em uma maca e será procedida a aferição de pressão arterial e

acompanhamento até normalização, caso o mal-estar persista a paciente será encaminhada à assistência médica. Referente à aplicação do

questionário, para evitar constrangimentos, estes serão executados por profissionais da área da saúde, sendo comunicado à paciente que esta

poderá se abster de responder as perguntas. A entrevista será realizada em sala isolada, minimizando os riscos de constrangimento. Ademais, os

riscos deste projeto envolvem a divulgação de dados de identificação das pacientes. Para minimizar os riscos de quebra de sigilo os nomes e

números de documentos de identidade das pacientes não serão divulgados em nenhum documento. Nomes e variáveis referentes a cada paciente

serão substituídos por números no momento da divulgação dos resultados da pesquisa, de forma a não divulgar qualquer informação referente à

amostra, que possa identificar os participantes. O arquivo contendo a planilha geral com os dados

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 6.578.539

será manipulado em um único computador de uso pessoal e de responsabilidade da equipe de pesquisa. No caso de os riscos se concretizarem o estudo será interrompido.

Benefícios:

Como benefícios podemos relatar que o diagnóstico específico de presença de HPV e o laudo do exame citológico é um importante exame preventivo de câncer de colo do útero. A paciente incluída no estudo será informada especificamente em relação ao exato vírus que a infecta, o que permitirá ao médico um melhor tratamento, aliviando de maneira mais eficiente os sintomas deste paciente. Ademais, a pesquisa trará como benefício indireto aos participantes, avaliar a frequência de exames citopatológicos alterados, bem como sua relação com as infecções pelo Papiloma Vírus Humano, com as neoplasias de colo uterino e sua distribuição no município de Passo Fundo, RS. Dessa forma, será possível planejar e executar medidas de promoção e prevenção de saúde que mudem a incidência e o prognóstico da doença, de modo que todas as pacientes possuam uma melhor qualidade de vida."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de submissão de emenda ao protocolo de pesquisa intitulado "Citologia cérvico-vaginal em meio líquido e diagnóstico molecular de Papiloma Vírus Humano (HPV) e infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) em mulheres em atendidas na Rede Básica de Saúde." para o qual o pesquisador responsável encaminhou a seguinte justificativa de emenda:

"Prezado(a) Coordenador(a), Solicito emenda ao projeto supracitado, a qual propõe a ampliação do período de recrutamento de participantes, entrevistas e coleta de material biológico para até novembro de 2025, prazo anteriormente previsto para ser executado até novembro de 2021. A justificativa é de que o n proposto não foi atingido, devido ao período pandêmico. Dessa forma, nenhuma abordagem adicional quanto à coleta de dados clínicos ou coleta adicional de material biológico serão necessárias. As alterações são detalhadas abaixo, assim como na versão com as referidas alterações destacadas em amarelo (arquivo: Projeto_Microbiota_emenda_2) e nos respectivos campos da Plataforma Brasil. 1. Listar cada uma das solicitações e a respectiva justificativa. 1.1. Inclusão de pesquisador: GIOVANA PAULA BONFANTTI DONATO (CPF: 468.280.100-78). Justificativa: A docente é uma das responsáveis pelo Ambulatório de

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECÓ

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 6.578.539

Ginecologia e participará da coleta das amostras a serem incluídas no projeto. 1.2. Alteração do texto no campo "Desenho": Local e período: O estudo será realizado na cidade de Passo Fundo, RS, entre 01 de dezembro de 2019 e 30 de dezembro de 2025. 1.3. Resumo: alteração do período de execução do estudo. 1.4. Bibliografia na introdução: não alterada 1.4. Tema/problemas/Hipótese e objetivos: não alterados 1.5. Campo "Metodologia Proposta": não alterados 1.6. Metodologia de análise de dados: não alterada 1.7. Cronograma de execução: Devido à proposição de ampliação do período de coleta, propõe-se um novo cronograma de desenvolvimento do projeto: Análise dos dados 01/05/2020 até 01/10/2025 Exames de laboratório 01/04/2020 até 01/05/2025 Inclusão de pacientes, aplicação de questionários e coleta de material biológico 01/03/2020 até 01/10/2025 Relatório final para o CEP 01/12/2025"

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador responsável anexou o projeto detalhado atualizado e a justificativa para submissão da emenda.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada

Não há pendências e/ou inadequações éticas, baseando-se nas Resoluções 466/2012 e 510/2016, do Conselho Nacional de Saúde, e demais normativas complementares. Logo, uma vez que foram procedidas pelo/a pesquisador/a responsável todas as correções apontadas pelo parecer consubstanciado, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul (CEP/UFFS) julga o protocolo de pesquisa adequado para, a partir da data deste novo parecer consubstanciado, agora de APROVAÇÃO, iniciar as etapas de coleta de dados e/ou qualquer outra que pressuponha contato com os/as participantes.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador(a)

A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa.

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 6.578.539

Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997. A página do CEP/UFFS apresenta alguns pontos no documento “Deveres do Pesquisador”.

Lembre-se que:

1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Veja modelo na página do CEP/UFFS. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.
2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.
3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicização dos resultados. Veja modelo na página do CEP/UFFS.

Em caso de dúvida:

Contate o CEP/UFFS: (49) 2049-3745 (8:00 às 12:00 e 14:00 às 17:00) ou cep.uffs@uffs.edu.br;

Contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitando ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;

Contate a “central de suporte” da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.

Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2259563_E2.pdf	04/12/2023 18:00:21		Aceito
Outros	Projeto_Microbiota_Emenda_2.docx	04/12/2023 17:59:23	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	Solicitacao_Emenda_2_Microbiota.doc	04/12/2023 17:58:38	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_Microbiota_Emenda.docx	12/02/2021	GUSTAVO	Aceito

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 6.578.539

/ Brochura Investigador	Projeto_Microbiota_Emenda.docx	16:29:28	OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	termo_ciencia_hsvp.pdf	27/11/2019 20:45:13	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	TCUD.pdf	19/11/2019 16:16:29	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	carta_resposta.pdf	14/11/2019 15:20:25	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/11/2019 15:19:54	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_completo_novo.pdf	14/11/2019 15:19:36	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_nova.pdf	14/11/2019 15:18:53	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	ficha_rotina.pdf	10/07/2019 19:55:10	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito
Outros	Instrumento_coleta.pdf	10/07/2019 19:54:45	GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 14 de Dezembro de 2023

Assinado por:

**Renata dos Santos Rabello
(Coordenador(a))**

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br

2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA

2.2.1 Apresentação

O presente relatório tem como objetivo descrever e detalhar pontos de pertinência sobre o projeto intitulado “Identificação de Espécies de *Lactobacillus iners* e não iners na Microbiota Vaginal”, conduzido pelo acadêmico Joao Augusto Berno Fachin e orientado pela Dra. Jossimara Poletini, docente da instituição, tendo como objetivo conhecer melhor a microbiota vaginal de mulheres atendidas em um ambulatório de Especialidade de Ginecologia via SUS, em Passo Fundo, RS, buscando, principalmente, identificar suas comunidades microbianas, em especial e de maior interesse, a *Community State Type* (CST) III – com predominância de *Lactobacillus iners*.

Trata-se de um recorte da pesquisa maior “Citologia cérvico-vaginal em meio líquido e detecção de Papiloma Vírus Humano (HPV), infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) e alteração de microbiota vaginal em mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde”, previamente aprovado pelos pareceres 3.736.932, 4.541.838 e 6.578.539, conforme Anexo 02.

As amostras de conteúdo vaginal foram coletadas previamente, com n estimado de aproximadamente 220 participantes, sendo que o discente, ao ingressar no projeto no semestre anterior, não acompanhou o processo de coleta e participará da análise laboratorial e molecular. Destas, 96 foram escolhidas randomicamente para integrar o estudo.

Pretende-se analisar a prevalência das principais espécies de *Lactobacillus*, da *Candida* spp. e identificar as queixas clínicas mais prevalentes. Com esses resultados, será observada a relação entre características sociodemográficas e de comportamento sexual com as espécies e, por fim, a relação entre *L. iners* predominante e a candidíase.

Os dados obtidos, ao final do projeto, serão compilados na forma de artigo, sendo submetidos na revista Archives of Gynecology and Obstetrics, cujas regras de submissão estão disponíveis em <https://link.springer.com/journal/404/submission-guidelines>.

2.2.2 Alterações de Protocolo

Para a obtenção de uma análise posterior e resultados mais amplos e fidedignos, optou-se pela substituição da técnica de PCR convencional, explicitada no tópico 2.1.7.4.2 (Protocolos para a análise laboratorial do conteúdo), pelo PCR em tempo real (rt-PCR). Assim, permitir-se-

á uma maior sensibilidade e precisão, além da possibilidade de quantificação relativa das espécies de Lactobacilos estudados. Outro benefício a ser ressaltado é a menor chance de contaminação, visto da não necessidade de pós-processamento dos produtos da PCR em análise por eletroforese. Também foi acrescentado para análise a espécie *Lactobacillus vaginalis*.

Para tanto, utilizou-se novas sequências de primers apresentados na Tabela 02, que, novamente, foram testados para compatibilidade via Plataforma BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), as quais atingiram uma identidade de 100%:

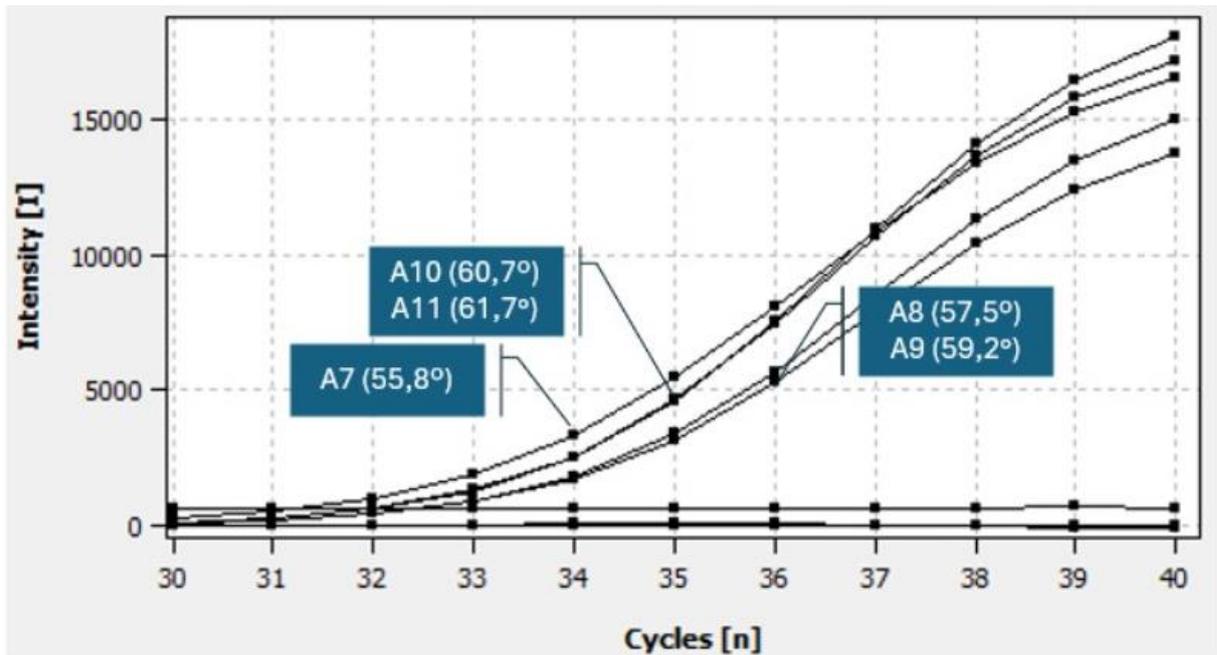
Tabela 02 – Novas sequências de primers para a identificação de espécies de Lactobacilos pela técnica de rt-PCR.

Nome da Espécie	Sequência Primer (5`-3`)
<i>Lactobacillus species</i>	ATGGAAGAACACCAGTGGCG-F CAGCACTGAGAGGCGGAAAC-R
<i>Lactobacillus crispatus</i>	AGCGAGCGGAACTAACAGATTTAC-F AGCTGATCATGCGATCTGCTT-R
<i>Lactobacillus jensenii</i>	AAGTCGAGCGAGCTTGCCTATAGA-F CTTCTTTCATGCGAAAGTAGC-R
<i>Lactobacillus gasseri</i>	AGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTG-F TCTTTTAAACTCTAGACATGCGTC-R
<i>Lactobacillus iners</i>	GTCTGCCTTGAAGATCGG-F ACAGTTGATAGGCATCATC-R
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	GCCTAACCATTTGGAGGG-F CGATGTGTAGGTTCCG-R

Fonte: Adaptado de Kim *et al.* (2016).

Para facilitação da logística, o teste de gradiente de temperaturas foi realizado com os primers, para que se pudesse atingir uma padronização entre elas. Utilizando um *pool* de amostras teste com o primer de *Lactobacillus species*, obteve-se como temperatura ótima de anelamento 55,8°C, seguidas por 60,7°C e 61,7°C, informação que pode ser apreciada na Figura 07:

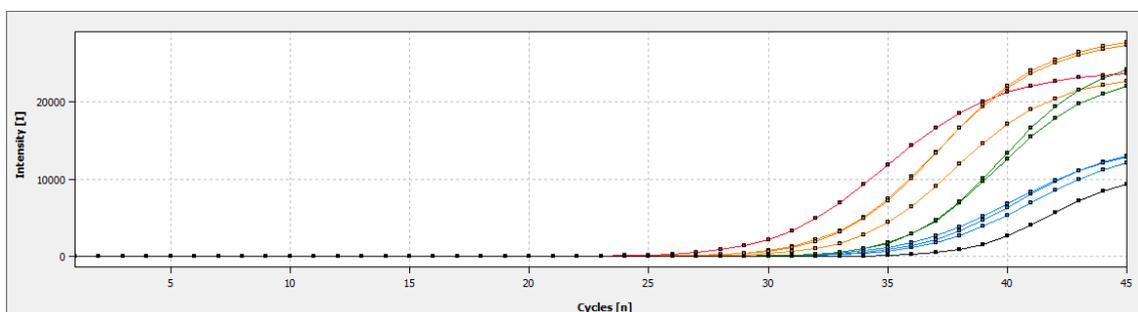
Figura 07 – Gráfico de representação dos resultados do teste de gradiente de temperaturas



Fonte: o Autor, 2024

Posteriormente, os primers para as espécies *Lactobacillus gasseri*, *L. iners*, *L. crispatus*, *L. janssenii* e *L. vaginalis* foram testados com um pool das amostras para especificação da eficiência e temperatura ideal de anelamento, conforme Figura 8. Observa-se que todas os primers foram eficientes em amplificar as regiões específicas de cada espécie. Dessa forma, a técnica foi padronizada e a próxima etapa do estudo consiste em avaliar as amostras das participantes de acordo com a presença e quantidade de cada espécie de interesse.

Figura 08 – Gráfico de representação dos resultados do teste de gradiente de temperaturas para as espécies de *Lactobacillus*



Fonte: o Autor, 2024

As curvas de amplificação, da figura acima, referem-se aos genes relativos às espécies de Lactobacilos: *L. gasseri* (azul), *L. iners* (vermelho), *L. crispatus* (laranja), *L. janseni* (verde) e *L. vaginalis* (preto).

Foram consideradas para fins de análise somente as amostras classificadas, por meio de microscopia com coloração Gram, em flora de tipo I, ou, como indicado por Nugent, Krohn e Hillier (1991), microbiota com predomínio de morfotipos de lactobacilos. Não foram considerados para a avaliação final o Whiff Test, devido a maior parte das pacientes não o ter realizado durante consulta, ou a análise da cândida por microscopia, visto a baixa prevalência na amostra.

MICROBIOTA VAGINAL: ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE LACTOBACILOS E RELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS

João Augusto Berno Fachin¹. Jossimara Poletini².

Número de palavras do artigo:

Número de figuras do artigo: 2 figuras

Número de tabelas do artigo: 4 tabelas

Resumo

Propósito Investigar as diferenças entre as abundâncias de tipos lactobacilares presentes em microbiotas vaginais, além de traçar possíveis relações com aspectos socioeconômicos, demográficos e clínicos.

Métodos Estudo transversal, no qual incluíram-se mulheres acima de 18 anos não gestantes, atendidas em ambulatório de Ginecologia. A coleta de dados foi feita por meio de questionário e exame ginecológico, com coleta de material cérvico-vaginal em meio líquido para exame de Papanicolaou e extração de DNA genômico total, que foram analisados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real, para a quantificação relativa da abundância das diferentes espécies de Lactobacilos. Foi ainda realizada coleta de esfregaço do terço médio da parede vaginal para análise microscópica. As variações entre as quantificações relativas de cada tipo de lactobacilo estudado (*Lactobacillus crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri* e *L. vaginalis*) em mulheres com microbiota considerada normal (flora I pelos critérios de Nugent) foram comparadas, assim como as relações entre as variáveis sociodemográficas e de queixas clínicas e cada espécie foram analisadas, adotando-se $p < 0,05$.

Resultados Nas 53 mulheres que compuseram a amostra, de maioria branca e entre 18 e 44 anos, houve um predomínio de queixas clínicas relacionadas a dispareunia e dor. Observou-se que a abundância relativa de *L. iners* e *L. crispatus* diferiu significativamente quando comparada a outros lactobacilos ($p < 0,05$), mas não entre si. Não foi encontrada diferenças entre as características sociais e clínicas e as espécies estudadas.

Conclusão A abundância das espécies de lactobacilos vaginais não se relaciona com características sociodemográficas, comportamentais ou sintomatologia específica, porém a predominância de *L. iners* sugere alerta quanto a outros fatores que podem conjuntamente favorecer uma disbiose de uma microbiota considerada normal.

Palavras-Chave saúde reprodutiva; *Lactobacillus iners*; *community state types*; reação em cadeia da polimerase; epidemiologia

O que este estudo acrescenta para a prática clínica? Evidencia-se que existem diferenças significativas entre a abundância de lactobacilos nas microbiotas vaginais consideradas normais de diferentes mulheres, o que poderia levar a maiores riscos de desenvolvimento de doenças ginecológicas. Além disso, reforça-se a atual escassez de pesquisas do tipo voltadas para abordagem clínica e epidemiológica dessas diferenças.

João Augusto Berno Fachin
joaoaugustoberno@hotmail.com

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. ORCID: 0009-0003-7950-0330

² Universidade Federal da Fronteira Sul, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. ORCID: 0000-0002-6719-8715

Introdução

Há tempos tem-se a concepção de que o organismo humano interage diretamente e é influenciado por um estado de comensalismo com ecossistemas de microrganismos presentes nos mais variados órgãos, que vão desde a modulação do sistema imune até a manutenção direta da homeostase por seu próprio metabolismo [1]. Com o avanço das técnicas de biologia molecular, pode-se olhar de maneira mais atenciosa a esses indivíduos, sejam eles benéficos ou patogênicos [2] e, inclusive, agrupá-los e analisar sua prevalência. Nesse contexto, a análise da microbiota vaginal tem particular importância, uma vez que organismos comensais, os Lactobacilos, produzem ácido lático e mantêm pH ácido para impedir a proliferação de outras bactérias patogênicas.

Ravel *et al.* [3] inaugura um novo momento na área ao classificar a microbiota vaginal em 5 grupos, conhecidos como *Community State Types (CSTs)*, sendo eles formados quando existe predominância de *Lactobacillus crispatus* (CST I), *Lactobacillus gasseri* (CST II), *Lactobacillus iners* (CST III) e *Lactobacillus jensenii* (CST V), além do CST IV, que representa uma comunidade sem um tipo mais abundante, sendo caracterizada por uma diversidade grande de bactérias. Em estudos, a CST III tem se apresentado como a comunidade dominante, alcançando até 36,5% das mulheres [5], acompanhada, em segundo lugar, da CST I, com 30,5% e, sendo a menos frequente a com predominância de *L. jensenii*, em apenas 1,2%. De novo, segundo Ravel *et al.* [3], essas proporções seriam alteradas conforme a etnicidade, por exemplo, nas mulheres asiáticas, a prevalência de CST I em mulheres negras seria de 22,1%, enquanto que em brancas seria de 45,4%.

Há considerável quantidade de evidências para afirmar que esses grupos não atuam de forma homogênea, mas apresentam características de estabilidade e proteção variáveis ao microambiente vaginal [4]. Em especial, o *L. iners* tem sido alvo de grandes discussões quanto a suas particularidades, sendo dito uma comunidade de transição entre um estado vaginal normal e um de disbiose [6], em contraposição ao *L. crispatus*, que parece fortalecer a capacidade de defesa da mucosa e incentivar a resposta imune local, ou seja, associado a uma situação saudável [7]. Diferentes mecanismos já foram propostos para tentar explicar essa diferença, e sugere-se que o *L. iners* apresente fator protetivo menor ou uma adaptação maior a ambientes adversos devido a diferenças metabólicas que levam, por exemplo, à não produção de D-ácido lático por essa espécie, ocasionando um pH mais alcalino. Além disso, alterações nos padrões inflamatórios e de metaloproteinases e expressão aumentada da família de citolisinas dependentes de colesterol são diferenciadas na predominância de *L. iners* [8-11].

Diante disso, o objetivo desse estudo foi determinar a prevalência dos predomínios das espécies de lactobacilos na microbiota vaginal e investigar sua relação com fatores sociodemográficos, comportamentais e clínicos, visando uma observação que auxilie na compreensão da dinâmica desses aspectos com o hospedeiro e com o meio.

Métodos

Trata-se de um estudo observacional transversal realizado entre fevereiro e agosto de 2024, na cidade de Passo Fundo, no Rio Grande do Sul (Brasil). Para a realização deste, foram incluídas mulheres atendidas no ambulatório de ginecologia e obstetrícia do Sistema Único de Saúde (SUS) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) para realização de exame

citopatológico de colo uterino, com coleta de material cérvico-vaginal em citologia de base líquida CellPreserv © (Kolplast). Adicionalmente, amostras do conteúdo vaginal foram coletadas do terço médio da parede vaginal utilizando-se zaragatoas estéreis para a confecção de esfregaços vaginais em lâminas de vidro em duplicata para coloração de GRAM e verificação dos morfotipos bacterianos ou espécies fúngicas presentes. Foram selecionadas aleatoriamente, dentro do grupo amostral maior, mulheres entre 18 e 64 anos, não gestantes, sem uso de antibiótico nos últimos 40 dias, sem atividade sexual nas 72 horas anteriores à coleta e cuja amostra fosse adequada ao estudo molecular. Todas as pacientes participantes foram informadas do uso de seus dados, assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido, e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS, segundo pareceres 3.736.932, 4.541.838 e 6.578.539. Além disso, também foram utilizadas informações de questionários respondidos pelas pacientes durante sua consulta, no qual constavam perguntas relacionadas à situação socioeconômica (renda mensal e escolaridade), demográfica (idade e cor) e de saúde reprodutiva e ginecológica (número de parceiros sexuais nos últimos 12 meses, uso de preservativo nas relações, queixas clínicas).

A partir do material coletado em meio líquido, o material genético foi extraído com o Kit de Extração de DNA Mini Spin Kasvi © e teve sua pureza testada por meio de espectrofotometria (Multiskan GO Microplate Photometer, Thermo Scientific, Massachusetts, United States ©). Subsequentemente, prosseguiu-se com a amplificação por técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) com o método *Sybr Green* (Promega ©) utilizando-se o protocolo e *primers específicos* descritos por Kim *et al.* [12] para *Lactobacillus species* e para cada uma das outras espécies – *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* e *Lactobacillus vaginalis*.

Com o resultado obtido, foi realizado o cálculo do ΔCt , ou seja, o Ct do *Lactobacillus species* de cada um dos exemplares subtraído do Ct de cada uma das espécies específicas correspondente. O ΔCt médio também foi calculado, utilizando-se, ao invés dos valores individuais, a média de cada conjunto. Logo após, os Cts isolados foram diminuídos do ΔCt médio, para a obtenção dos números de $\Delta\Delta Ct$. Ao final, os montantes foram substituídos em $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, indicando a quantificação relativa de cada amostra para cada microrganismo, que foram também, exceto os resultados nulos, transformados em logaritmos de base 10 (\log_{10}) para melhor representação gráfica.

As amostras foram então avaliadas por meio de microscopia com coloração de Gram, e foram selecionadas, para o escopo do trabalho e das análises estatísticas, apenas as que pudessem ser classificadas como Flora Vaginal de Tipo I. Determina-se Tipo I segundo o escore de Nugent [13], quando a microbiota se manifesta com predomínio de morfotipos lactobacilares e diz-se “normal”.

Por fim, com o uso dos *softwares* de distribuição livre PSPP e R, foi realizado o estudo estatístico dos dados. Calculou-se a prevalência de positividade, média, desvio padrão e erro padrão da média de cada um dos lactobacilos e se utilizou do teste de Shapiro-Wilk (W) para verificar a normalidade da distribuição. Em seguida, mediante teste de Kruskal-Wallis (H), e *post-hoc* de Dunn, comparou-se a diferença da mediana da quantificação relativa (cálculo do ΔCt) entre os grupos de lactobacilos. Para a análise das variáveis sociodemográficas e clínicas, a média de cada tipo de lactobacilo serviu como ponto de corte para dicotomização da categoria em \leq média ou $>$ média, o que permitiu o uso do teste de Chi-Quadrado de Pearson (X^2) para

o estudo da relação entre os microrganismos e as características das pacientes. Todos os testes consideraram um p-valor de 5% e excluíram dados considerados como ausentes.

Resultados

Foram incluídas 53 mulheres que apresentaram microbiota vaginal classificadas como Flora I (normal), sendo que a maior parte delas possui idade entre 18 e 44 anos (62,3%), cor branca (60,4%), renda familiar de 1 a 3 salários mínimos (74,5%) e 5 anos ou mais de escolaridade (56,5%) (Tabela 1). Ainda, 96% delas afirmaram ter mantido apenas um parceiro sexual nos 12 meses que antecediam o questionário e a maioria delas (76,5%) afirmou usar preservativo em todas as relações. As duas queixas clínicas mais referidas foram a de dispareunia, em 38,8% das pacientes e dor em 32% (Tabela 1).

Tabela 1 Caracterização das variáveis sociodemográficas, comportamentais e queixas clínicas apresentadas por mulheres atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal da Fronteira Sul (Passo Fundo, RS) entre dezembro de 2019 e dezembro de 2022 (n=53)

Variáveis Sociodemográficas		
	n	%
Idade		
18 a 44 anos	33	62,3
45 a 64 anos	20	37,7
Cor/Raça		
Branca	32	60,4
Outra	21	39,6
Renda Familiar Mensal (n=47)		
Até 1 salário mínimo	8	17
1 a 3 salários mínimos	35	74,5
Mais que 3 salários mínimos	4	8,5
Escolaridade (n=46)		
4 anos completos ou menos	20	43,5
5 anos completos ou mais	26	56,5
Variáveis Comportamentais		
Número de Parceiros Sexuais nos Últimos 12 Meses (n=50)		
1 parceiro	48	96,0
Mais de um parceiro	2	4,0
Uso de Preservativo nas Relações Sexuais (n=51)		
Em todas as relações	39	76,5
Algumas ou nenhuma	12	23,5
Queixas Clínicas e Avaliação		
	n	%
Leucorreia		
Sim	8	15,1
Não	45	84,9
Odor (n=50)		
Sim	7	14,0
Não	43	86,0
Dor (n=50)		
Sim	16	32,0
Não	34	68,0
Amenorreia		
Sim	15	28,3
Não	33	62,3
Dispareunia (n=49)		
Sim	19	38,8
Não	30	61,2
Prurido (n=50)		
Sim	7	14,0
Não	43	81,1

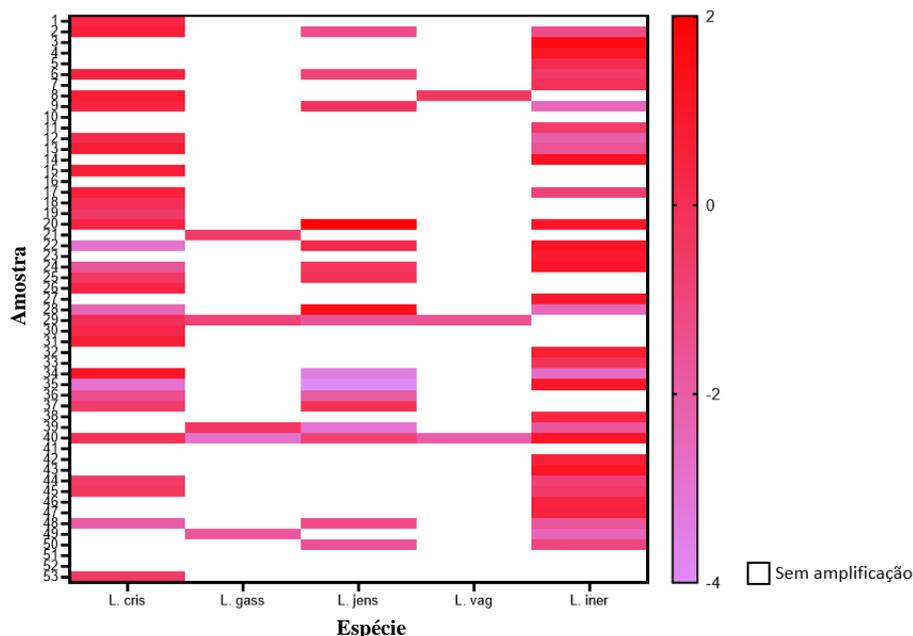
No que se refere à análise molecular, o lactobacilo mais prevalente foi o *Lactobacillus iners*, presente em 60,4% das pacientes analisadas, sucedido pelo *L. crispatus* (54,7%), *L. jensenii* (32,1%), *L. gasseri* (11,3%) e, finalmente, o menos prevalente foi o *L. vaginalis* (5,7%). Referente à quantificação relativa, quando analisadas as médias de cada espécie, nota-se que elas seguem a mesma tendência, com a maior abundância da amostra sendo a de *L. iners* ($3,223 \pm 6,426$) e a menor a de *L. vaginalis* ($0,008 \pm 0,055$), exposto na Tabela 2.

Tabela 2 Média (\bar{x}), desvio padrão (s), erro padrão da média ($SE_{\bar{x}}$), mediana (Md), mínimo (min) e máximo (max) da quantificação relativa de cada espécie de lactobacilo analisado na amostra

Espécie	\bar{x}	s	$SE_{\bar{x}}$	Md	min	max
<i>L. crispatus</i>	1,097	1,988	0,273	0,014	0	10,411
<i>L. gasseri</i>	0,016	0,073	0,010	0	0	0,463
<i>L. jensenii</i>	0,539	3,162	0,438	0	0	22,78
<i>L. vaginalis</i>	0,008	0,055	0,007	0	0	0,4
<i>L. iners</i>	3,223	6,426	0,882	0,05	0	36

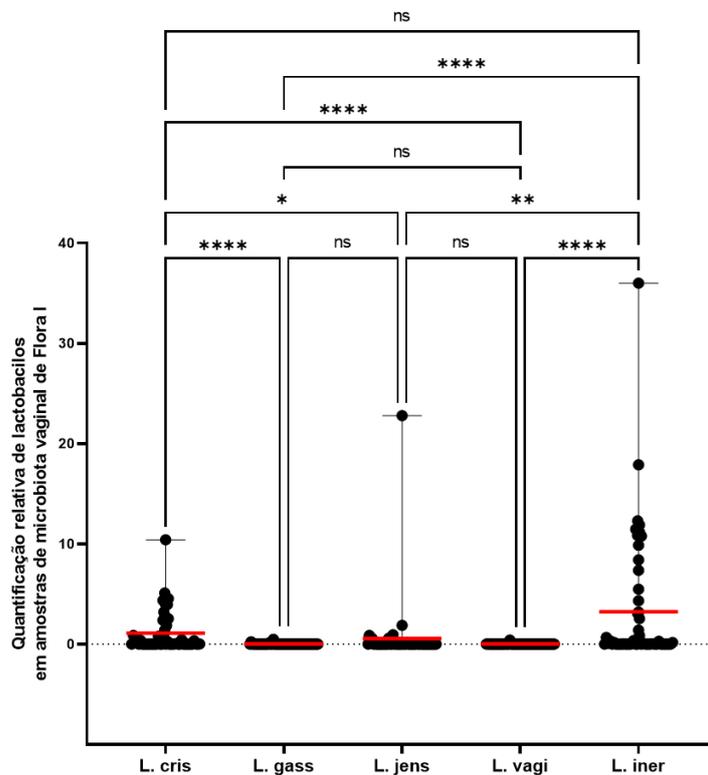
Uma representação gráfica dos dados pode ser vista no *heatmap* da Figura 1, com as cores mais escuras sendo os menores valores e o branco os exemplares que não amplificaram a determinada espécie; o eixo Y é representativo do número de cada amostra, enquanto que o eixo X do tipo de lactobacilo. Observa-se que 25 das amostras apresentaram-se positivas mais de uma espécie, enquanto que 23 o fizeram para apenas uma; finalmente, 5 delas não positivaram para nenhuma das espécies estudadas.

Fig. 1 *Heatmap* da quantificação relativa das espécies de lactobacilos em cada uma das amostras individuais, com valores representados em \log_{10}



A Figura 2 demonstra a diferença da quantificação relativa entre as espécies de lactobacilos, e constatou-se que *L. iners* (0,05 [0-36]) e *L. crispatus* (0,014 [0-10,411]) diferiram significativamente de todas as outras espécies ($p < 0,05$), mas não entre si. De maneira similar, todas as outras espécies apresentaram diferença somente quando comparadas a *L. iners* e *L. crispatus*, mas não entre si.

Fig. 2 Gráfico *dot blot* de dispersão da quantificação relativa das diferentes espécies de lactobacilos em amostras de conteúdo cérvico vaginal de mulheres atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal da Fronteira Sul (Passo Fundo, RS) entre dezembro de 2019 e dezembro de 2022 (n=53)



(Teste Kruskal-Wallis, seguido do teste *post-hoc* de Dunn: **** $p < 0,0001$; ** $p = 0,0002$; * $p = 0,024$; ns: $p > 0,05$. As barras vermelhas indicam o valor da média de cada grupo para melhor visualização)

Não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre as variáveis sociodemográficas e comportamentais de acordo com os valores médios das quantificações relativas feitas para cada microrganismo, como evidenciado na Tabela 3, padrão que se repete quando vistas as queixas clínicas na Tabela 4.

Tabela 3 Relação entre variáveis sociodemográficas e comportamentais e as espécies de lactobacilos mais frequentes na amostra de mulheres atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal da Fronteira Sul (Passo Fundo, RS) (n=53)

	<i>L. crispatus</i>			<i>L. jensenii</i>			<i>L. iners</i>		
	≤ \bar{x} n (%)	> \bar{x} n (%)	p*	≤ \bar{x} n (%)	> \bar{x} n (%)	p*	≤ \bar{x} n (%)	> \bar{x} n (%)	p*
Variáveis Sociodemográficas									
Idade									
18 a 44 anos	25 (47,2)	8 (15,1)	0,64	27 (50,9)	6 (11,3)	0,17	19 (35,8)	14 (26,4)	0,20
45 a 64 anos	14 (26,4)	6 (11,3)		19 (35,8)	1 (1,9)		15 (28,3)	5 (9,4)	
Cor/Raça									
Branca	26 (49,1)	6 (11,3)	0,12	27 (50,9)	5 (9,4)	0,52	18 (34,0)	14 (26,4)	0,14
Outra	13 (24,5)	8 (15,1)		19 (35,8)	2 (3,8)		16 (30,2)	5 (9,4)	
Renda Familiar Mensal (n=47)									
Até 1 salário mínimo	5 (10,6)	3 (6,4)	0,37	7 (14,9)	1 (2,1)	0,12	4 (8,5)	4 (8,5)	0,40
1 a 3 salários mínimos	26 (55,3)	9 (19,1)		31 (66,0)	4 (8,5)		25 (53,2)	10 (21,3)	
Mais que 3 salários mínimos	4 (8,5)	0 (0,0)		2 (4,3)	2 (4,3)		2 (4,3)	2 (4,3)	
Escolaridade (n=46)									
4 anos completos ou menos	13 (28,3)	7 (15,2)	0,37	18 (39,1)	2 (4,3)	0,39	14 (30,4)	6 (13,0)	0,39
5 anos completos ou mais	20 (43,5)	6 (13,0)		21 (45,7)	5 (10,9)		15 (32,6)	11 (23,9)	
Variáveis Comportamentais									
Número De Parceiros Sexuais nos Últimos 12 Meses (n=50)									
1 parceiro	35 (70,0)	13 (26,0)	0,48	42 (84,0)	6 (12,0)	0,59	31 (64,0)	17 (34,0)	0,67
Mais de um parceiro	1 (2,0)	1 (2,0)		2 (4,0)	0 (0,0)		1 (2,0)	1 (2,0)	
Uso de Preservativo nas Relações Sexuais									
Em todas as relações	6 (11,3)	13 (24,5)	0,12	6 (11,3)	0 (0,0)	0,31	3 (8,8)	3 (8,8)	0,44
Algumas ou nenhuma	20 (37,8)	14 (26,4)		40 (75,5)	7 (13,2)		31 (58,5)	16 (30,2)	

* Teste de Chi-Quadrado de Pearson (X^2).

Tabela 4 Relação entre as espécies de lactobacilos mais frequentes na amostra e queixas clínicas de mulheres atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal da Fronteira Sul (Passo Fundo, RS) (n=53)

	<i>L. crispatus</i>			<i>L. jensenii</i>			<i>L. iners</i>		
	≤ \bar{x} n (%)	> \bar{x} n (%)	p*	≤ \bar{x} n (%)	> \bar{x} n (%)	p*	≤ \bar{x} n (%)	> \bar{x} n (%)	p*
Queixas Clínicas e Avaliação									
Leucorreia									
Sim	6 (11,3)	2 (3,8)	0,92	8 (15,1)	0 (0,0)	0,23	5 (9,4)	3 (5,7)	0,92
Não	33 (62,3)	12 (22,6)		38 (71,7)	7 (13,2)		29 (54,7)	16 (30,2)	
Odor (n=50)									
Sim	4 (8,0)	3 (6,0)	0,34	6 (12,0)	1 (2,0)	0,98	3 (6,0)	4 (8,0)	0,26
Não	32 (64,0)	11 (22,0)		37 (74,0)	1 (6,0)		28 (56,0)	15 (30,0)	
Dor (n=50)									
Sim	10 (20,0)	6 (12,0)	0,30	13 (26,0)	3 (6,0)	0,51	10 (20,0)	6 (12,0)	0,96
Não	26 (52,0)	8 (16,0)		30 (30,0)	4 (8,0)		21 (42,0)	13 (26,0)	
Amenorreia (n=48)									
Sim	10 (20,8)	5 (10,4)	0,67	14 (29,2)	1 (2,1)	0,29	10 (20,8)	5 (10,4)	0,55
Não	24 (50,0)	9 (18,8)		27 (56,3)	6 (12,5)		19 (39,6)	14 (29,2)	
Dispareunia (n=49)									
Sim	11 (22,4)	8 (16,3)	0,09	18 (36,7)	1 (2,0)	0,15	13 (26,5)	6 (12,2)	0,41
Não	24 (49,0)	6 (12,2)		24 (49,0)	6 (12,2)		17 (34,7)	13 (26,5)	
Prurido (n=50)									
Sim	6 (12,0)	1 (2,0)	0,38	6 (12,0)	1 (2,0)	0,98	3 (6,0)	4 (8,0)	0,26
Não	30 (60,0)	13 (26,0)		37 (74,0)	6 (12,0)		28 (56,0)	15 (30,0)	

* Teste de Chi-Quadrado de Pearson (X^2).

Discussão

O presente estudo caracterizou mulheres atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do SUS, a qual foi predominantemente formada por mulheres de 18 a 44 anos, brancas e com renda familiar de até 3 salários mínimos mensais. Em primeiro lugar, pode-se dizer que os dados de abundância dos tipos de lactobacilos na microbiota vaginal normal estão em concordância com os achados gerais da literatura. Tendo como base somente os grupos formados predominantemente por lactobacilos, temos o CST III (*L. iners*) como mais prevalente e abundante na amostra, seguido pelo CST I (*L. crispatus*), CST II (*L. gasseri*) e, com menor representatividade, CST V (*L. jensenii*). Apesar de variações nos percentuais, a ordem de frequência permaneceu a mesma quando comparada à vista por outros autores [3, 5].

Em relação às variáveis socioeconômicas e comportamentais, nosso estudo destaca-se entre os poucos a realizar tal abordagem, especialmente em mulheres brasileiras, portanto, deparando-se com escassez de outros trabalhos. Não foram encontradas relações significativas entre esses fatores e os tipos de lactobacilos, o que se contrapõe a Novak *et al.* [14], que, por exemplo, identificam uma relação inversamente proporcional entre o nível educacional e o número de parceiros e microbiotas dominadas pelo *Lactobacillus iners*, assim como entre maior número de parceiros e o grupo. Esse desencontro pode ser justificável devido ao n reduzido de nossa amostra e, também, a um possível viés de resposta das participantes, que se configura como limitação. Tal viés pode ser evidenciado ao contrastar, por exemplo, a informação obtida que 76,5% das mulheres usa preservativo em todas as relações sexuais, ao passo que a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) de 2019, demonstrou que apenas 22,8% no Brasil e 20,3% na Região Sul tem esse hábito [15].

Outras pesquisas indicaram diferenças entre os tipos de microbiota e lactobacilos e a raça/etnia das pacientes [3, 16-18], mas, nossos dados estão de acordo com as de Novak *et al.* [14] e Marconi *et al.* [5], já citadas anteriormente, que estudam especificamente a população do Brasil. Deve-se levar em conta a individualidade do cenário brasileiro, que é destacadamente miscigenado, inclusive adotando a palavra “pardo” como categoria oficial de autodeclaração, sendo esta influenciada por fatores genéticos, mas também socioculturais e históricos [19].

No tocante à relação entre queixas clínicas e abundância de lactobacilos, não possuímos conhecimento de publicações com o mesmo escopo, fato que limita nossas análises comparativas. Observa-se, em primeiro lugar, não haver relação significativa entre nenhuma dessas queixas e a abundância dos tipos de lactobacilos. Tal resultado pode ser, mais uma vez, interpretado a luz de um baixo n, principalmente de queixas clínicas em si, havendo poucas observações de cada uma. Entretanto, a literatura evidencia um papel de manutenção de microbiota saudável associado a alguns microrganismos, como o *Lactobacillus crispatus*, em vários contextos, como em uma menor prevalência de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) [20] e menor chance de transição para estados de disbiose [4, 20].

Há um consenso na literatura sobre o papel protetivo dos lactobacilos em relação à produção de moléculas protetoras e ativadoras do sistema imune. No entanto, recentes estudos ressaltam que, mais controverso, por sua vez, é o *L. iners* e sua atuação no ecossistema vaginal. Glick *et al.* [21] identificaram uma nova classe de supressor inflamatório das vias ativadas por TLR2, 3 e 4, que é produzido por múltiplos lactobacilos vaginais. Tal molécula é a betacarbolina, tendo os autores encontrado redução de inflamação vaginal após sua aplicação tópica em camundongos. No entanto, *L. iners* não apresentou produção inibidora significativa de tais vias. Adicionalmente, Maidment *et al.* [22] descreveram, apesar de nossa amostra ser formada por

não-gestantes, que na comunidade vaginal dessas há persistência de colonização por *Streptococcus agalactiae* (do Grupo B), uma bactéria colonizadora do trato genital inferior, quando em condições hostis, teve abundância significativamente maior de *L. iners*, comparado com outros grupos de mulheres com predominância de outros tipos, como *L. crispatus*, *L. gasseri* or *L. jensenii*. Somado a isso, outros trabalhos da atualidade trazem o seu grupo de predominância, CST III, como uma microbiota de transição entre um estado saudável e de vaginose bacteriana (substituição dos lactobacilos por microbiota cocácea) [22-24], e de um padrão inflamatório basal [25]. Essas evidências embasam que o *L. iners* possa de fato ter um papel contraditório às demais espécies de lactobacilos vaginais, e a maior predominância de mulheres estudadas com a presença de *L. iners* alerta sobre uma possível maior susceptibilidade de diminuição de resposta imune e persistência de outros microrganismos. Por outro lado, a não diferença entre abundância de *L. crispatus* e *L. iners* pode sugerir que ainda exista um certo equilíbrio entre lactobacilo protetor ou não na microbiota vaginal da população estudada, e o entendimento de outros fatores intrínsecos e extrínsecos que possam direcionar a resposta predominante precisam ser melhor estudados.

Por fim, da mesma forma, a presença de maiores ou menores médias de *L. jensenii* não esteve relacionado com queixas. A comunidade com predomínio desse tipo de lactobacilo ainda tem sua estabilidade debatida na literatura [22-23, 26] e cujas características ainda não estão bem descritas principalmente por sua baixa prevalência e, em resultado disso, insuficientes pesquisas. Um estudo recente encontrou diferenças entre assinaturas genômicas de cepas coletadas em mulheres associadas a partos prematuros e a termo [27], o que, a nível molecular e imune, pode ter implicações também ginecológicas ao compor a interação entre os organismos comensais e o seu hospedeiro, assim levando a explicações ainda não conhecidas para o achado desse trabalho. Outro ponto de interesse relativo a isso, é a reclassificação de cepas de *L. jensenii* para *L. mulieris* [28-30], trazendo a necessidade de reexplorar sua antes concebida função benéfica.

Assim, pode-se concluir que, considerando a população estudada e metodologia empregada, a abundância das espécies de lactobacilos vaginais não se relaciona com características sociodemográficas, comportamentais ou sintomatologia específica, porém a predominância de *L. iners* sugere alerta quanto a outros fatores que podem conjuntamente favorecer uma disbiose de uma microbiota considerada normal. Além disso, há a necessidade de trabalhos não somente espécie-específicos na área, mas também, a abordagem genômica e de linhagens, o que com certeza há de contribuir para o avanço de nosso entendimento quanto às relações hospedeiro-hospedeiro aqui esboçadas e as lacunas de bibliografia delineadas. Outro fator limitante, além da deficiência de literatura já apresentada, foi nossa amostra relativamente pequena, o que sugere também a demanda de estudos com grupos maiores.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES Todos os autores contribuíram para o desenvolvimento do projeto, coleta dos dados e análise. A redação primária do artigo foi realizada por João Augusto Berno Fachin e, em seguida, comentada e revisada por Jossimara Poletini. Todos os autores aprovaram a versão final.

DECLARAÇÕES

CONFLITOS DE INTERESSE Os autores declaram não possuir conflitos de interesse, sejam eles financeiros ou não.

APROVAÇÃO ÉTICA E CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) segundo os pareceres 4.541.838 e 3.736.932. Todas as participantes tiveram conhecimento das características da pesquisa e do uso dos dados e do material biológico, assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para sua participação.

CONSENTIMENTO PARA PUBLICAÇÃO Não aplicável.

FINANCIAMENTO O custeio das despesas foi realizado por meio de financiamento oriundo da Universidade Federal da Fronteira Sul, especificado no edital n. 459/GR/UFFS/2019 “fomento à pesquisa com ênfase no fortalecimento dos programas de pós-graduação *stricto sensu* da UFFS”.

DISPONIBILIDADE DOS DADOS Os dados não estarão disponíveis de maneira pública devido a sensibilidade do conteúdo, mas podem ser disponibilizados sob requisição razoável ao autor correspondente.

Referências

1. Wells J. M. (2011). Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microbial cell factories*, 10 Suppl 1(Suppl 1), S17. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S17>
2. Chee, W. J. Y., Chew, S. Y., & Than, L. T. L. (2020). Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microbial cell factories*, 19(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01464-4>
3. Ravel, J. et al (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
4. van de Wijgert, J. H., et al (2014). The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization?. *PloS one*, 9(8), e105998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105998>
5. Marconi, C., et al (2020). Characterization of the Vaginal Microbiome in Women of Reproductive Age From 5 Regions in Brazil. *Sexually transmitted diseases*, 47(8), 562–569. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001204>
6. Petrova, M. I., Reid, G., Vaneechoutte, M., & Lebeer, S. (2017). *Lactobacillus iners*: Friend or Foe?. *Trends in microbiology*, 25(3), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.007>
7. Kalia, N., Singh, J., & Kaur, M. (2020). Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 19(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>
8. Beghini, J., et al (2015). Differential expression of lactic acid isomers, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and matrix metalloproteinase-8 in vaginal fluid from women with vaginal disorders. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 122(12), 1580–1585. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.13072>
9. Tachedjian, G., Aldunate, M., Bradshaw, C. S., & Cone, R. A. (2017). The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Research in microbiology*, 168(9-10), 782–792. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.04.001>
10. France, M. T., Mendes-Soares, H., & Forney, L. J. (2016). Genomic Comparisons of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus iners* Reveal Potential Ecological Drivers of Community Composition in the Vagina. *Applied and environmental microbiology*, 82(24), 7063–7073. <https://doi.org/10.1128/AEM.02385-16>
11. Macklaim, J. M., et al (2013). Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome*, 1(1), 12. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-12>
12. Kim, J. H., et al (2017). Predominant *Lactobacillus* species types of vaginal microbiota in pregnant Korean women: quantification of the five *Lactobacillus* species and two anaerobes. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 30(19), 2329–2333. <https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1247799>
13. Nugent, R. P., Krohn, M. A., & Hillier, S. L. (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of clinical microbiology*, 29(2), 297–301. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.297-301.1991>

14. Novak, J., et al (2022). Characteristics associated with *Lactobacillus iners*-dominated vaginal microbiota. *Sexually transmitted infections*, 98(5), 353–359. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2020-054824>
15. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (2020). Pesquisa Nacional de Saúde: 2019: Acidentes, violências, doenças transmissíveis, atividade sexual, características do trabalho e apoio social. IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento, Rio de Janeiro.
16. Jespers, V., et al (2012). Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC microbiology*, 12, 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-83>
17. Zhou, X., et al (2007). Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *The ISME journal*, 1(2), 121–133. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.12>
18. Hyman, R. W., et al (2014). Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 21(1), 32–40. <https://doi.org/10.1177/1933719113488838>
19. Lima-Costa, M. F., et al (2015). Genomic Ancestry, Self-Rated Health and Its Association with Mortality in an Admixed Population: 10 Year Follow-Up of the Bambui-Epigen (Brazil) Cohort Study of Ageing. *PLoS one*, 10(12), e0144456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144456>
20. Chee, W. J. Y., Chew, S. Y., & Than, L. T. L. (2020). Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microbial cell factories*, 19(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01464-4>
21. Glick, V. J., et al (2024). Vaginal lactobacilli produce anti-inflammatory β -carboline compounds. *Cell Host & Microbe*, 32, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.09.014>
22. Maidment, T., et al. (2024). Group B *Streptococcus* vaginal colonisation throughout pregnancy is associated with decreased *Lactobacillus crispatus* and increased *Lactobacillus iners* abundance in the vaginal microbial community. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 14, 1435745. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1435745>
23. Petrova, M. I., et al (2015). *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Frontiers in physiology*, 6, 81. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00081>
24. Argentini, C., et al (2022). Evaluation of Modulatory Activities of *Lactobacillus crispatus* Strains in the Context of the Vaginal Microbiota. *Microbiology spectrum*, 10(2), e0273321. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02733-21>
25. De Seta, F., et al (2019). The Vaginal Community State Types Microbiome-Immune Network as Key Factor for Bacterial Vaginosis and Aerobic Vaginitis. *Frontiers in microbiology*, 10, 2451. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02451>
26. Verstraelen, H., et al (2009). Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC microbiology*, 9, 116. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-116>
27. Nori, S. R. C., et al (2023). Profiling of vaginal *Lactobacillus jensenii* isolated from preterm and full-term pregnancies reveals strain-specific factors relating to host interaction. *Microbial genomics*, 9(11), 001137. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001137>
28. Jimenez, N. R., et al (2023). Commensal *Lactobacilli* Metabolically Contribute to Cervical Epithelial Homeostasis in a Species-Specific Manner. *mSphere*, 8(1), e0045222. <https://doi.org/10.1128/msphere.00452-22>
29. Putonti, C., et al (2020). Comparative Genomic Study of *Lactobacillus jensenii* and the Newly Defined *Lactobacillus mulieris* Species Identifies Species-Specific Functionality. *mSphere*, 5(4), e00560-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00560-20>
30. Ene, A., Banerjee, S., Wolfe, A. J., & Putonti, C. (2023). Exploring the genotypic and phenotypic differences distinguishing *Lactobacillus jensenii* and *Lactobacillus mulieris*. *mSphere*, 8(4), e0056222. <https://doi.org/10.1128/msphere.00562-22>

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao finalizar esse estudo, pode-se olhar para ele com certos olhos de pioneirismo. Ao mesmo tempo em que nos deparamos com uma limitação de referências e literatura, vimos nisso a oportunidade de contribuir, mesmo que de maneira restrita, no estudo e entendimento do perfil microbiológico vaginal das mulheres no Brasil. Conhecer as características epidemiológicas locais permite, para além de contrastes com a literatura de maioria estrangeira, orientar novos passos e caminhos.

Ainda que alguns dos estudos iniciais não puderam ser cumpridos, devido, talvez, a uma baixa quantidade amostral que não nos permitiu ter algumas análises estatisticamente significativas, mesmo assim traz-se resultados de relevância. Notando a alta abundância do *Lactobacillus iners*, delinea-se um cenário de preocupação que levanta mais perguntas que conclusões, como, por exemplo, de que forma podemos extrapolar esses resultados para a prática clínica em um futuro?

Com absoluta certeza esperamos que esse trabalho, mais do que ser um livro fechado e completo, se torne um capítulo aberto para novos autores que desejem se aventurar nessas águas misteriosas, com novas pesquisas e novos ares para o desenvolvimento do assunto.