

***Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* em amostras cervicais de mulheres com candidíase vulvovaginal e com vaginose bacteriana**

***Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in cervical samples from women with vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis**

Borborema-Santos, Cristina Maria^{1*}, Coelho, Yanne Gabrielle Siqueira¹, Almeida, Mellissa Gabriela Soares¹, Souza, Antônio Vinícius Soares¹, Barbosa-Filho, Roberto Alexandre Alves¹, Costa-Lira, Evelyn¹.

RESUMO

A microbiota vaginal tem uma importância fundamental na saúde do trato genital feminino. A presença de *Ureaplasma spp.* tem sido relatada com frequência em estudos de correlação com o Papilomavírus Humano (HPV). Objetivou-se determinar a prevalência de *Ureaplasma parvum* (UP) e *Ureaplasma urealyticum* (UU) em mulheres com Vaginose Bacteriana (VB) e Candidíase Vulvovaginal (CVV) e correlacionar com HPV. Extraíu-se o DNA genômico de 64 amostras cervicais, utilizando o kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit. Identificou-se UP e UU por Multiplex PCR convencional e para HPV utilizou-se Nested PCR/sequenciamento. Verificou-se que a prevalência de UP no grupo de CVV foi de 87,8% (29/33) e no de VB foi de 96,7% (30/31). O UU demonstrou prevalência de 81,8% (27/33) nas amostras de CVV e 67,7% (21/33) nas de VB. Quanto ao HPV, 27,2% (9/33) das amostras de CVV foram positivas para a presença deste patógeno e nas amostras de VB, 35,4% (11/31) das amostras também foram positivas. Observou-se que existe uma tendência de infecção pelo HPV na presença de *Ureaplasma spp.* em especial o UP. Todavia, tal afirmação não pode ser confirmada neste trabalho por não demonstrar significância estatística.

Palavras-chave: *Ureaplasma parvum*; *Ureaplasma urealyticum*; Candidíase vulvovaginal; Vaginose bacteriana.

ABSTRACT

The vaginal microbiota is of fundamental importance in the health of the female genital tract. The presence of *Ureaplasma spp.* has been reported frequently in studies correlating with Human Papillomavirus (HPV). We aimed to determine the prevalence of *Ureaplasma parvum* (UP) and *Ureaplasma urealyticum* (UU) in women with Bacterial Vaginosis (BV) and Vulvovaginal Candidiasis (VVC) and correlate with HPV. Genomic DNA was extracted from 64 cervical samples using the commercial QIAamp® DNA Mini Kit. UP and UU were identified by conventional Multiplex PCR and Nested PCR/sequencing was used for HPV. It was found that the prevalence of UP in the VVC group was 87.8% (29/33) and in the BV group it was 96.7% (30/31). UU showed prevalence of 81.8% (27/33) in CVV samples and 67.7% (21/33) in VB samples. As for HPV, 27.2% (9/33) of the CVV samples were positive for the presence of this pathogen and in the BV samples, 35.4% (11/31) of samples were also positive. It was observed that there is a trend of HPV infection in the presence of *Ureaplasma spp.* especially UP. However, this statement cannot be confirmed in this work because it did not show statistical significance.

¹ Universidade Federal do Amazonas

*E-mail: crisantos@ufam.edu.br

Keywords: *Ureaplasma parvum*; *Ureaplasma urealyticum*; Vulvovaginal Candidiasis; Bacterial Vaginosis.

INTRODUÇÃO

A microbiota vaginal de mulheres em idade reprodutiva é normalmente e predominantemente composta por diferentes *Lactobacillus spp*, os quais incluem *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii*, entre outros. A maioria produz H₂O₂ e grandes quantidades de ácido láctico, em destaque o *Lactobacillus crispatus*, o que ajuda a prevenir a infecção por outros microrganismos sem induzir inflamação, sendo altamente benéfico. Todavia, as comunidades de *Lactobacillus iners* são frequentemente instáveis e geralmente associam-se à microrganismos anaeróbios incluindo os gêneros *Gardnerella sp.*, *Ureaplasma sp.* e *Prevotella sp.* os quais possuem potencial de causar vaginose bacteriana. Além disso, através de uma meta-análise realizada por Norenhag et al. (2020), observou-se que a microbiota vaginal com dominância de *Lactobacillus iners* ou espécies não-lactobacillus, apresentava um risco de 2 a 3 vezes maior para infecções por papilomavírus humano de alto risco (HPV-HR) e displasia/câncer cervical quando comparado com *Lactobacillus crispatus* (TACHEDJIAN et al., 2017; STOUT et al., 2020; NORENHAG et al., 2020).

A vaginose bacteriana (VB) é caracterizada por uma desordem vaginal polimicrobiana que ocorre quando a microbiota vaginal dominante por *Lactobacillus spp.* é alterada pela diminuição da proporção de bactérias produtoras de ácido láctico, e o consequente aumento do pH (>4,5) fato que propicia o crescimento de bactérias anaeróbias, levando a uma disbiose da microbiota vaginal. Além disso, contribui para o aumento do risco de infecção por patógenos sexualmente transmissíveis. As bactérias associadas à vaginose bacteriana incluem *Gardnerella vaginalis*, *Megasphaera spp*, *Atopobium vaginae*, *Dialister spp*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens*, *Porphyromonas asaccharolytica*, e *Prevotella bivia*. Entretanto, ainda não foi descrita uma etiologia específica, sendo considerada como uma complexa interação micróbio-hospedeiro (ANATHAR et al., 2015; ONDERDONK et al., 2016; PETROVA et., 2013; SOPER, 2020).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção ou distúrbio que afeta a mucosa genital, mais especificamente as regiões da vulva e vagina. Caracteriza-se pela presença exacerbada de *Lactobacillus spp*, que ocasiona a diminuição do pH devido a grande

produção de ácido láctico e favorece o aumento da colonização por *Candida spp.* as quais são leveduras comensais da mucosa vaginal e digestiva que se tornam patogênicas durante determinadas condições que alteram o ambiente vaginal. Essa condição é causada, principalmente, pela espécie *Candida albicans*, uma vez que é capaz de aderir ao epitélio vaginal com mais facilidade do que outras espécies de Cândida, sendo responsável por 80 a 90% dos casos. A segunda espécie mais importante nos casos de CVV é a *Candida glabrata*, a qual apresenta resistência aos agentes antifúngicos, no entanto a CVV pode ser causada por outras espécies de Cândida (FURTADO et al., 2018; BRANDOLT et al., 2017; CDC, 2020).

O maior enigma para os pesquisadores nos últimos anos é a determinação do estado autóctone da microbiota vaginal, ou seja, qual a variação das comunidades bacterianas quantitativamente e qualitativamente que pode ser aceita como dentro dos limites normais e que não desencadeiem estados patogênicos (DRELL et al., 2013). O avanço das técnicas moleculares que permitem a identificação de bactérias independentes de meios de cultura tem revolucionado os estudos das comunidades bacterianas. A amplificação de genes que codificam o 16S rRNA bacteriano e o sequenciamento de última geração (NGS) com posterior análise das sequências por programas de bioinformática tem permitido um avanço e caracterização da microbiota vaginal saudável e patogênica (LINHARES et al., 2010; MITRA et al., 2015).

O estudo da microbiota vaginal de 187 mulheres utilizando sequenciamento de última geração em quatro grupos com condições clínicas diferentes (flora autóctone, CVV, VB e um grupo com lesões pré-malignas e malignas do colo do útero) demonstrou a presença de grande quantidade do gênero *Ureaplasma* nas mulheres com lesões pré-malignas e malignas do colo do útero (COSTA-LIRA, 2017).

No estudo realizado por Szostek et al. (2014) analisou-se a relação entre a presença de agentes infecciosos detectados no trato geniturinário humano e as alterações na expressão da oncoproteína E6 do HPV-16 em linhagem de células SiHa. O *Ureaplasma urealyticum* dentre todos os agentes infecciosos testados foi o que estimulou a expressão da proteína E6 do HPV- 16, resultando em quase cinco vezes o aumento nos níveis de mRNA de E6 nas células SiHa. A atividade da oncoproteína viral E6 assim como a E7, são as principais responsáveis pela tumorigênese mediada pelo HPV, tendo em vista que ao integrar-se no DNA do hospedeiro, essas oncoproteínas são

superexpressas. A proteína E6 do HPV leva a degradação da p53 (proteínas supressoras de tumor celular) por ligação direta à proteína celular ubiquitina ligase E6AP (proteína associada a E6). Dessa forma, sugeriu-se que a infecção do trato urogenital por *Ureaplasma urealyticum* (UU) poderia aumentar o risco de câncer do colo de útero (SCHEFFNER et al., 1993 apud SZOSTEK et al., 2014).

Drago et al. (2016) encontraram uma forte correlação entre a neoplasia intraepitelial cervical de grau 1, o HPV e a infecção por *Ureaplasma parvum* (UP). Seus dados sugeriram uma possível relação entre a infecção por UP e o desenvolvimento de anormalidades citológicas relacionadas ao HPV. Amorim et al. (2017) estudaram 132 mulheres, sendo 62 mulheres com lesões cervicais e 70 mulheres sem lesões cervicais com o objetivo de detectar agentes infecciosos sexualmente transmissíveis que poderiam estar agindo concomitantemente com o HPV para a transformação maligna das células do colo uterino. Os autores concluíram que a carga de UP foi maior nas mulheres com lesões cervicais.

O gênero *Ureaplasma spp.* caracteriza-se por bactérias em forma de cocobacilos, desprovidas de parede celular, com diâmetro de 0,2 a 0,3 µm e que também são chamadas de Micoplasmas, habitam o trato urogenital e são transmitidas por via sexual e verticalmente através de fluidos corporais infectados. São considerados agentes patogênicos oportunistas visto que com frequência são isolados do trato urogenital de pessoas saudáveis e também de doentes. São bactérias que utilizam a uréia como fonte energética, sendo incapazes de metabolizar carboidratos. Possuem 14 sorotipos divididos em dois grupos: *Ureaplasma parvum* (sorotipos 1, 3, 6 e 14) e *Ureaplasma urealyticum* (10 sorotipos restantes). Estão presentes em maior proporção em indivíduos com múltiplos parceiros sexuais. Muitos autores têm demonstrado a importância do *Ureaplasma urealyticum* na persistência da infecção do HPV de alto risco e transformação maligna (LUKIC et al., 2006; VOORDE, BALZARINI & LIEKENS, 2014).

Mitra et al. (2015) estudaram amostras cervicais de 169 pacientes distribuídas em 92 lesões intraepiteliais cervicais de alto grau - HSIL, 52 lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau - LSIL, 5 (cinco) câncer invasivo e 20 controles sem lesão e caracterizaram a microbiota vaginal. Os pesquisadores concluíram que quanto maior a severidade da lesão maior a diversidade da microbiota vaginal que pode estar envolvida na persistência

da infecção pelo HPV e progressão maligna. Além disso, é aceitável que existam cofatores, relacionados ao microbioma vaginal, que podem interferir no processo de infecção e persistência do HPV, mas também para o aumento do risco de desenvolvimento de neoplasia cervical (SUEHIRO et al., 2019; CONTRERAS et al., 2015).

Em recente trabalho publicado por Chao et al. (2019) onde estudaram microbiota vaginal de 151 mulheres saudáveis sendo 65 HPV positivas e 86 HPV negativas também sugerem um possível papel da composição da microbiota vaginal como modificadora da infecção pelo HPV de alto risco e progressão das lesões intraepiteliais para o câncer.

Diante dos resultados de Costa-Lira (2017), e sendo o câncer de colo do útero o câncer mais prevalente nas mulheres do estado do Amazonas depois do câncer de pele não melanoma (INCA, 2021) este trabalho tem por objetivo determinar a prevalência das espécies de *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* em amostras cervicais de pacientes com CVV e VB, assim como relacionar esses resultados com a presença do DNA do HPV.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas como adendo ao Projeto “Diversidade microbiana do trato genital feminino” (COSTA-LIRA, 2017) e aprovado com CAAE nº07223419.7.0000.5020.

2.1. Amostras

Utilizou-se um total de 64 amostras de material cervical coletadas no período de outubro de 2013 a abril de 2014 de 33 mulheres com CVV e 31 mulheres com VB que estavam armazenadas em freezer -80°C no laboratório de Diagnóstico molecular do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (CAM/UFAM). As mulheres são residentes no estado do Amazonas e atendidas na rede pública de saúde. Para categorização das amostras em seus grupos clínicos foi realizado no momento da coleta o teste do KOH a 10%, assim como medida do pH nos três sítios ectocérvice, endocérvice e vagina. Além disso foi realizado exame citológico de todas as mulheres. A definição do grupo VB seguiu os critérios de Amsel et al.(1983), ou seja, presença de corrimento branco ou acinzentado com aspecto homogêneo ou microbolhoso, teste do KOH positivo (Teste de Whiff), pH > 4,5 e citologia positiva para vaginose bacteriana.

O grupo CVV foi definido utilizando dados clínicos e do exame especular como corrimento branco, espesso e grumoso com prurido, teste de Whiff negativo, exame citológico com evidência de organismos morfológicamente semelhantes da *Candida sp.*, além de pH < 4,5.

2.2. Extração e quantificação do material genômico total

A extração do DNA genômico total foi realizada de acordo com o protocolo adaptado do kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Biotecnologia do Brasil LTDA e mantidas a -20°C. A concentração de DNA das amostras foi estimada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop®.

2.3. Controle endógeno da viabilidade das amostras

Para confirmação da presença do DNA cromossomal humano amplificável conservado e controle da viabilidade do DNA extraído realizou-se PCR convencional para o gene constitutivo da β -globina que amplificam um fragmento correspondente a 235 pb.

2.4. Desenho dos iniciadores (*primers*)

Os iniciadores foram desenhados utilizando as ferramentas Primer BLAST e Primer 3, atentando para a proximidade entre as Tm dos *primers*, evitando inter e intracomplementaridade e amplificação de alvos indesejados, certificando-se da especificidade dos iniciadores com os alvos (Tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados para a detecção molecular de *U. parvum* e *U. urealyticum*

Microrganismo	Primer*	5'	Sequência 3'	Região	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Ureaplasma</i> <i>urealyticum</i>	UU _{fwd} UU _{rev}	CCTGATGGAATATCGAAACGA CTGGTGACCGTCCTATCCA		ureB	139
<i>Ureaplasma</i> <i>parvum</i>	UP _{fwd} UP _{rev}	CTAATGCCAGGGGACCCAA GTATTAGCACGCTCTGCGG		deoD	620

* forward (fwd) e reverse (rev).

Fonte: Grupo Diagnóstico Molecular- FCF/UFAM, (2020).

2.5. Detecção molecular de *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum*

Utilizou-se PCR convencional multiplex para detecção do UP e UU. O sistema de amplificação do DNA dos patógenos citados foi padronizado numa reação cujo volume final foi de 25 µL, sendo composto por 2,5 µL de Tampão 10X, 0,8 µL de dNTP 10mM, 1,0 µL de MgCl₂ 50mM, 2,0 µL de UU_{fwd} 5pmol, 2,0 µL de UU_{rev} 5pmol, 2,0 µL de UP_{fwd} 5pmol, 2,0 µL de UP_{rev} 5 pmol, 0,2 µL de enzima Platinum®Taq DNA polimerase (Invitogen, Brasil) 5U/ µL, 7,5 de água Milli-Q, 5,0 µL de DNA.

A reação foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA) e os ciclos de temperatura consistiram na desnaturação inicial a 95°C/1min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C/45seg, anelamento a 55°C/45seg e extensão a 72°C/45seg, seguidos de extensão final a 72°C/5min.

Os produtos da reação de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com 1µL de brometo de etídeo [10mg/mL], em tampão TEB 1X (Tris-Borato-EDTA), sob tensão elétrica de 70 a 100 volts, por 80 minutos. Os géis foram visualizados por fluorescência sob luz UltraVioleta em transiluminador UVP™ e fotografados em sistema digital.

2.6. Detecção do Papiloma Vírus Humano

A detecção do Papilomavírus e sua genotipagem nas amostras de CVV e VB foi realizado Nested-PCR utilizando os primers MY09/MY11 e GP5/GP6 (MANOS et al.,1989; SNIJEDERS et al., 1990). O tipo de HPV foi determinado por sequenciamento (método de Sanger), em aparelho ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City,CA, USA). As sequências foram editadas e alinhadas utilizando-se o programa Bioedit 7.2.5 (Hall, 1999). As sequências no formato FASTA foram analisadas e comparadas com as sequências depositadas no NCBI (GeneBank), utilizando o programa BLASTN.

2.7. Análises estatísticas

A análise da significância de diferença de proporções e avaliação de existência ou não de associação entre as variáveis qualitativas foi realizada utilizando-se o Teste Exato de Fisher. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5% com um intervalo de

confiança de 95%. Todas as análises foram feitas através do pacote R2.9.0 (R Core Team, 2022).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 64 amostras mostraram-se viáveis para realização da PCR convencional Multiplex e foram padronizadas para concentração de 20 ng/ µL. Todas as 64 amostras positivaram para o gene da betaglobina, assim, confirmou-se, não só a presença e integridade do DNA humano, como também para a confiabilidade da detecção dos patógenos em estudo.

3.1. Detecção molecular e prevalência de *Ureaplasma spp.* (PCR)

3.1.1. Detecção molecular e prevalência de *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* em Candidíase Vulvovaginal (PCR)

Do total das 33 amostras cervicais de mulheres que apresentavam CVV, o *Ureaplasma parvum* demonstrou prevalência de 87,8% (29/33) e o *Ureaplasma urealyticum* 81,8% (27/33) neste grupo. Sendo este achado consistente com o estudo de Foschi et al. (2018), que avaliou a presença de Molliculites como o *U. parvum* e o *U. urealyticum* em 23 mulheres com CVV e verificou que a prevalência de UP (65,2%) foi maior que a prevalência de UU (8,7%).

Plummer et al. (2021), em trabalho realizado na Austrália, verificaram por PCR se a presença *M. hominis*, UU e UP estava associada a sintomas e/ou sinais em mulheres não grávidas atendidas em um serviço de saúde sexual. Como o *M. hominis* não é alvo deste trabalho, não iremos tratar aqui os resultados relativos a este patógeno. Esse estudo envolveu 1272 mulheres, das quais 32% (403/1272) testaram positivo para UU em 72% (910/1272) para UP. Das pacientes positivas para UU apenas 100/403 (25%) foram diagnosticadas simultaneamente com CVV, e das positivas para UP, 223/910 (25%) estavam nessa mesma condição clínica, apresentando uma prevalência proporcionalmente semelhante para ambas espécies. Os autores observaram que UU e UP não apresentaram associação estatística com os sinais e sintomas em mulheres não grávidas, assim como a CVV. Nossos resultados demonstram que UP apresenta maior prevalência em relação a UU e, apesar de uma alta prevalência destes patógenos, não foi observada relação estatisticamente significativa entre CVV com a presença de UP e UU, fato que corrobora com os resultados de Plummer et al. (2021).

3.1.2. Detecção molecular e prevalência de *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* em Vaginose Bacteriana

Do total de 31 amostras cervicais de mulheres com VB verificou-se que a prevalência de UP neste grupo foi de 96,7% (30/31) e do UU foi de 67,7% (21/33), mas apesar de uma alta prevalência em nossos resultados, não houve significância estatística ($p > 0,05$). Plummer et al. (2021) evidenciaram que tanto o UU quanto o UP apresentaram associação estatística significativa com a VB (OR= 1,55, IC 95%:1,20-2,00) e (OR= 1,45, IC 95%:1,09-1,92), respectivamente.

Molina et al. (2007) pesquisaram a presença de micoplasmas numa população de 89 mulheres que apresentavam vaginose bacteriana, utilizando a técnica de PCR convencional e observaram que 77,5% (69/89) possuíam micoplasmas urogenitais dos quais foram identificados como *M. hominis* (71%), UP (23,2%) e UU (5,8%). Em nosso estudo não fizemos a detecção de *M. hominis*, porém observamos uma prevalência bem superior do UP e UU em mulheres com VB.

Ainda, em um estudo feito por Rumyantseva et al. (2019), o qual utilizou a técnica de qPCR para verificar a prevalência de *Mycoplasma hominis*, UP e UU em 754 mulheres que foram diagnosticadas com vaginose bacteriana, observou-se que a prevalência de UP foi de 59,9%, enquanto que a do UU foi de 13,5%, a saber o de *Mycoplasma hominis* foi de 26,8%. Deste modo, observa-se que em situações de vaginose bacteriana, quando comparadas as prevalências das espécies de *Ureaplasma spp.*, o UP demonstra ser o mais prevalente. De acordo com Taylor-Robinson (2017), os ureaplasmas ocorrem com maior frequência nos casos de VB do que naqueles sem a doença; no entanto, não apresentam um papel definido nessa condição clínica que pode se desenvolver na ausência desses microrganismos.

3.2. Detecção do HPV

Após a genotipagem do HPV nas amostras deste estudo, observou-se que 27,2% (9/33) das amostras de CVV foram positivas para a presença de algum tipo de HPV, sendo estes o HPV-16 (1 amostra), HPV-31 (1 amostra), HPV-53 (1 amostra), HPV-54 (1 amostra), HPV-58 (2 amostras), HPV-61 (1 amostra), HPV-62 (1 amostra) e HPV-102 (1 amostra). Em relação as amostras de VB, verificou-se que 35,4% (11/31) apresentaram positividade para o HPV, sendo estes o HPV-16 (4 amostras), HPV-33 (1 amostra), HPV

-58 (1 amostra) e HPV-59 (1 amostra), HPV-61 (2 amostras), HPV-70 (2 amostras). Observou-se que no grupo de mulheres positivas para CVV e VB, o genótipo prevalente foi o HPV-58 com 22,22% (2/9) e HPV-16 com 36,36% (4/11), respectivamente. Além disso, ao realizar uma análise geral da infecção pelo HPV nas 64 amostras (CVV + VB) do estudo, notou-se que 31,25% (20/64) das amostras apresentaram infecção pelo HPV. Assim, dentre as 20 amostras positivas, o HPV-16 estava presente em 25% (5/20) dessas amostras, seguido pelo HPV-58 com 15% (3/20) e o HPV 61 também com 15% (3/20). O HPV- 70 com 10% (2/20); os demais tipos HPV (-31,33,53,54,59,62 e 102) identificados representaram 5% (1/20) para cada um dos tipos. Dessa forma, observou-se que o HPV-16 foi o genótipo prevalente na amostragem geral (CVV+VB) do estudo. Segundo de Villiers et al. (2004) e Muñoz et al. (2003) os HPVs encontrados nos dois grupos os são classificados como alto risco: HPV-16, HPV-31, HPV-33, HPV-58 e HPV-59; provável alto risco HPV- 53; baixo risco: HPV-54, HPV-61, HPV-70; e risco indeterminado: HPV-62 e HPV-102. Foram observados HPV de alto risco nas duas condições clínicas CVV e VB, as quais apresentam risco de evoluírem para neoplasia intraepitelial cervical e, se houver integração viral, para um câncer cervical. Observou-se ainda que a presença de HPV foi maior no grupo de VB e muitos trabalhos apontam que quanto maior a diversidade microbiana, maior a tendência do HPV se tornar persistente e integrar-se ao genoma do hospedeiro (Lee et al., 2013; Chao et al., 2019). Portanto, mulheres portadoras de HPV de alto risco necessitam de vigilância epidemiológica (INCA, 2021; ZERLOTTI et al., 2018). É importante salientar que a metodologia utilizada neste trabalho para genotipagem do HPV não permite avaliar coinfeções.

3.3. Correlação do *Ureaplasma spp* e HPV

Para Martinelli et al. (2019) a infecção por HPV é a causa necessária, mas não suficiente para o câncer cervical, tendo em vista que outros cofatores podem desempenhar um papel, influenciando a persistência do HPV e o progresso da doença cervical. Esses cofatores podem ser patógenos presentes na microbiota que podem diminuir a capacidade do hospedeiro de resolver a infecção. Dessa forma, ao analisar a coinfeção (Tabela 2, Gráfico 1) por UU/UP, UP/HPV, UU/HPV e UP/UP/HPV em ambos os grupos, verificou-se que no grupo de CVV composto de 33 mulheres, 51,5% (17/33) foram positivas para ambos os patógenos (UU/UP), nenhuma foi positiva para a coinfeção UP/HPV, 6% (2/33) para UU/HPV e 21,2% (7/33) para a coinfeção por UP/UU/HPV. Já no grupo de 31 mulheres com VB, 41,9% (13/31) foram positivas somente para ambos

os patógenos (UU/UP), 6,4% (2/31) para UP/HPV, nenhuma amostra foi positiva para a coinfeção UU/HPV, 24,8% (8/31) foram positivas para a coinfeção UU/UP/HPV.

Realizou-se o teste de Fisher e OR para verificar a relação entre as infecções por *U. parvum* e *U. urealyticum* com HPV, onde se observou tendência a infecção por HPV em amostras positivas para *U. parvum* e negativas para *U. urealyticum* (OR= 0,276 para UP+HPV e OR= 2,35 para UU+HPV). Porém, os valores de $p > 0,05$ ($p = 0,1714$ para UP+HPV e $p = 0,3506$ para UU+ HPV) demonstram que os dados não apresentam significância estatística. Além disso, o teste exato de Fisher, também não mostrou significância estatística ($p > 0,05$) da relação entre as variáveis Grupo (CVV e VB) e os valores dos patógenos (Tabela 2). No Gráfico 1, é possível observar que os dois grupos demonstraram ter pouca diferença em relação ao padrão de variação. Todavia, os valores de razão de chance (Odds Ratio, OR) indicam que as infecções de *U. parvum* e HPV tendem a estar mais presentes no grupo de CVV (OR > 1), já o valor de OR igual a 0,4723162 indica que a infecção por *U. urealyticum* tende a ocorrer mais no grupo de VB (Tabela 2).

Nesta pesquisa, apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, verificou-se que existe uma tendência de infecção pelo HPV na presença de *Ureaplasma spp.* o que é um dado preocupante, visto que foi relatado em literaturas recentes que a presença de uma IST acaba não só facilitando a entrada e a persistência do HPV através de uma inflamação cervical crônica e ulceração no epitélio cervical, mas também ocasiona uma mudança nas vias de resposta imunológica, assim tornando o indivíduo suscetível a infecção por outros patógenos (VERTERAMO et al., 2009; ALOTAIBI et al., 2020).

Além disso, verificou-se que o grupo CVV e VB demonstraram a prevalência de *U. parvum*, sendo o grupo CVV o que apresentou tendência de coinfeção do *U. parvum* e o HPV. Desse modo, essas duas condições clínicas requerem uma atenção especial, tendo em vista que Drago et al. (2016) relataram a existência de uma forte correlação do *Ureaplasma parvum* com a neoplasia intraepitelial cervical de grau 1 e o HPV. Ainda, a frequência, relativamente alta em ambas as condições clínicas, encontradas neste projeto, do *Ureaplasma urealyticum* também se torna preocupante, tendo em vista que Szostek et al. (2014) demonstraram em seus estudos que a presença de *Ureaplasma urealyticum*,

pode aumentar o risco de câncer cervical através da superexpressão do oncogene E6 do HPV, o qual é responsável pela degradação da p53 (proteína supressora de tumor).

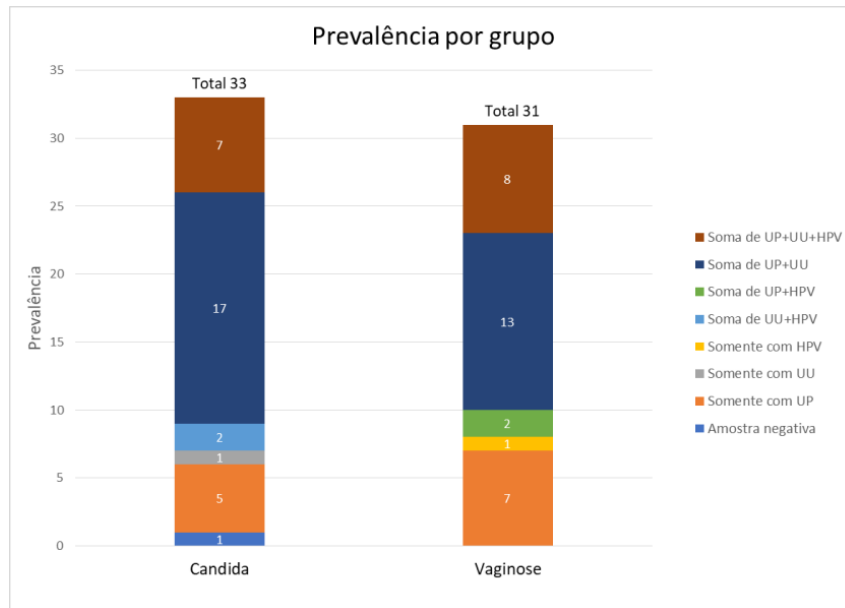
Tabela 2. Relação de positividade para *U. parvum*, *U. urealyticum* e HPV

Valores	Candidose Vulvovaginal	Vaginose Bacteriana	Total Geral	Fisher	Odds ratio IC= 95%
Soma de <i>U. parvum</i>	29	30	59	0,356	4,0574
Somente <i>U. parvum</i>	5	7	12		
<i>U. parvum</i> + <i>U. urealyticum</i>	17	13	30		
<i>U. parvum</i> + HPV	0	2	2		
<i>U. parvum</i> + <i>U. urealyticum</i> + HPV	7	8	15		
Soma de <i>U. urealyticum</i>	27	21	48	0,2524	0,4723162
Somente <i>U. urealyticum</i>	1	0	1		
<i>U. urealyticum</i> + <i>U. parvum</i>	17	13	30		
<i>U. urealyticum</i> + HPV	2	0	2		
<i>U. urealyticum</i> + <i>U. parvum</i> + HPV	7	8	15		
Soma de HPV	9	11	20	0,5919	1,457839
Somente HPV	0	1	1		
HPV + <i>U. parvum</i>	0	2	2		
HPV + <i>U. urealyticum</i>	2	0	2		
HPV + <i>U. parvum</i> + <i>U. urealyticum</i>	7	8	15		

Fonte: Grupo Diagnóstico Molecular- FCF/UFAM, (2020).

Um trabalho de revisão sistemática e metanálise realizado por Ye et al. (2018) analisou a associação infecção genital por mycoplasmas e infecção por HPV em mulheres com citologia cervical anormal e câncer cervical e concluíram que o *U. urealyticum* e *U. parvum* demonstram uma associação estatisticamente significativa com o aumento do risco de infecção por HPV (OR= 1,57; OR= 3,02), respectivamente.

Gráfico 1. Prevalência e coinfecção do *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* e HPV no grupo de amostras de Vaginose Bacteriana e Candidíase Vulvovaginal.



Fonte: Grupo Diagnóstico Molecular- FCF/UFAM, (2020).

Costa-Lira (2017) em seu trabalho de doutorado onde estudou a diversidade microbiana do trato genital feminino utilizando sequenciamento de última geração após amplificação das regiões V1-V2 do gene 16S rRNA e observou que o gênero *Lactobacillus* constituiu a maior proporção nos quatro grupos estudados, sendo flora autóctone, CVV, VB e um grupo de mulheres com lesões pré-malignas do colo do útero. Porém, observou um dado bem interessante que quando foi excluído o gênero *Lactobacillus* das análises, o grupo com lesões pré-malignas do colo uterino o gênero *Ureaplasma* foi o mais abundante.

Alotaibi et al. (2020) demonstraram em seus estudos a existência de uma associação significativa entre *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*, HPV de alto risco e citologia cervical anormal. Em estudo realizado por Martinelli et al. (2019) verificou-se a presença de coinfecção entre HPV e ISTs (Infecções sexualmente transmissíveis) sendo o *Ureaplasma parvum*, o patógeno sexualmente transmissível mais prevalente (37/65, 56,9%), seguido por *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* e *Trichomonas vaginalis*. Portanto, é notável a existência de uma associação entre o *Ureaplasma spp.* e a infecção pelo HPV.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, ao analisar a frequência das espécies de *Ureaplasma spp.* e comparar com a positividade para o Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres com Candidíase e Vulvovaginal (CVV) e Vaginose Bacteriana (VB), verificou-se que em ambas as condições clínicas houve a prevalência da espécie *Ureaplasma parvum*. No entanto, não se observou significância estatística na presença dos patógenos nos dois grupos, fato este que pode ter sido influenciado pelo tamanho amostral. Além disso, observou-se que as mulheres positivas para VB e CVV apresentaram infecção por HPV de alto risco. Todavia, apesar dos resultados referentes à coinfeção pelo HPV e *Ureaplasma spp.* não serem estatisticamente significativos, notou-se que houve uma tendência de infecção pelo HPV na presença de *Ureaplasma parvum* em mulheres com CVV. Dessa forma, faz-se necessário a realização de mais pesquisas, com um tamanho amostral maior, envolvendo a presença de *Ureaplasmas spp* na microbiota vaginal infectada por HPV, principalmente em condições de VB e CVV. Vale ressaltar que existem dados na literatura que sugestionam a influência de ISTs na persistência da infecção por HPV e esta persistência, por sua vez, pode evoluir para um quadro de neoplasia cervical.

AGRADECIMENTO

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) por financiar este projeto. URL: <http://www.fapeam.am.gov.br>

REFERÊNCIAS

- ALOTAIBI, H. J. et al. Association of sexually transmitted infections and human papillomavirus co-infection with abnormal cervical cytology among women in Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 6, p. 1587-1595, 2020.
- AMORIM, A. T. et al. Co-infection of sexually transmitted pathogens and Human papillomavirus in cervical samples of women of Brazil. **BMC Infectious Diseases**. v.17, p.769-780, 2017.
- AMSEL R, TOTTEN PA, SPIEGEL CA, CHEN KC, ESCHENBACH D, HOLMES KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial. **Am J Med**, v.74, n.1, p.14-22, 1983.
- ANATHAR, M.N.; BYRNE, E.H; DOHERTY, K.E.; BOWMAN, B.A. et al. Cervical bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. **Immunity**, v.42, p.965-976, 2015.
- BRANDOLT, T. M; KLAFKE G. B; GONÇALVES, C. V; BITENCOURT, L. R; MARTINEZ, A. M. B; MENDES, J, F et al. Prevalence of *Candida spp.* in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. **Braz. J. Microbiol.** v. 48, n. 1, p. 145-150, 2017.

- CDC. Center for Disease Control and Prevention. **2015 Sexually Transmitted Diseases. Treatment Guidelines: Vulvovaginal Candidiasis.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/std/tg2015/candidiasis.htm>>. Acesso em: 17 fev 2020.
- CHAO, X.P.; SUN, T.T.; WANG, S. et al. Correlation between the diversity of vaginal microbiota and the risk human papillomavirus infection. **Int. Gynecol Cancer**. v.29 p.28-34. 2019.
- CONTRERAS, P, A. et al. Prevalence of Sexually Transmitted Pathogens Associated With HPV Infection in Cervical Samples in a Mexican Population. **J. Med. Virol**. v. 87, n. 12, p. 2098–2105, 2015.
- COSTA-LIRA, E. **Diversidade microbiana do trato genital feminino.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, p. 142. 2017.
- DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; zur HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004
- DRAGO, F et al. *Ureaplasma parvum* as a Possible Enhancer Agent of HPV-Induced Cervical Intraepithelial Neoplasia: Preliminary Results. **J Med Virol**. v. 88, n.12, p. 2023 - 2024, 2016.
- DRELL, T.; LILLSAAR, T. et al. Characterization of the vaginal micro- and microbiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. **PLoS ONE**, v.8,n.1, p.1-11, 2013.
- FOSCHI, C.; SALVO, M.; D'ANTUONO, A.; GASPARI, V.; BANZOLA, N.; CEVENINI,R.; MARANGONI, A. Distribution of genital Mollicutes in the vaginal ecosystem of women with different clinical conditions. **New Microbiol**.v.41, n. 3, p.225-229, 2018.
- FURTADO, H. L. A et al. Fatores predisponentes na prevalência da candidíase vulvovaginal. **Rev. Investig. Bioméd.** São Luís, v.10, n.2, p.190-197, 2018.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v.41, p.95-98, 1999.
- INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2019.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da saúde. **Ações de controle do câncer de colo do útero: Detecção precoce.** 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/acoes-de-controle/deteccao-precoce>> Acesso em: 22 fev. 2022.
- LEE, J.E.; LEE, S.; LEE, H.; SONG, Y.; KAYOUNG LEE, K.; HAN, M.J.; SUNG, J.; KO, G. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. **PLoS ONE**, v.8, n.5, p.e63514, 2013.
- LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E. C. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 370-374, 2010.
- LUKIC, A. CANZIO, C.; PATELLA, A.; GIOVAGNOLI, M. R.; CIPRIANI, P.; FREGA, A; MOSCARINI, M. **Anticancer Research**, v.26, p.4843-4850, 2006.
- MANOS, M.M.; TING, Y.; WRIGHT D.K.; LEWIS, A.I.; BROKER, T.R.; WOLINSKY, S.M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v.7, p.209-214, 1989.
- MARTINELLI, M. et al. Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) and Other Sexually Transmitted Infections (STIs) among Italian Women Referred for a Colposcopy. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. vol. 16, n° 24, 2019.

- MITRA, A.; MACINTYRE, D.A.; LEE, Y.S.; SMITH, A.; MARCHESI, J.R.; LEHNE, B.; BHATIA, R.; LYONS, D.; PARASKEVAIDIS, E.; LI, J.V.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J.K.; BENNETT, P.R.; KYRGIU, M. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. **Scientific Reports**, v.5, n.16865, p.1-11, 2015
- MOLINA, C.F.; MARTÍNEZ, Y.Z.; PREVAL, N.R.; GONZÁLEZ, I. R.; CORCHO, D.B.; GONZÁLEZ, L. M. O. Diagnóstico de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes con vaginosis bacteriana. **Rev Cubana Med Trop**. v. 59, n.2, 2007.
- MUÑOZ N.; BOSCH F.X.; SANJOSE S. HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P.J.F.; MEIJER, C.J.L.M.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) MULTICENTRIC CERVICAL CANCER STUDY GROUP. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v.348, p.518–527, 2003.
- NORENHAG, J.; DU, J. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta – analysis. **BJOG**. v.127, n. 2, p.171-180, 2020.
- ONDERDONK, A. B; DELANEY, M. L.; FICHOROVA, R. N. The human microbiome during bacterial vaginosis. **Clin Microbiol Ver**, v. 26, p. 223-238, 2016.
- PETROVA, M.I.; van den BROEK, M.; BALZARINI, J.; VANDERLEYDEN, J.; LEBEER, S. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. **FEMS Microbiol Rev**, v.37,n.5, p.762-792, 2013.
- PLUMMER, E. L. et al. Are *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* Associated With Specific Genital Symptoms and Clinical Signs in Nonpregnant Women?. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 4, p. 659-668, 2021.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021
- RUMYANTSEVA, T.; KHAYRULLINA, G.; GUSCHIN, A.; DONDEERS, G. Prevalence of *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis* in healthy women and patients with flora alterations. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.93, n.3, p.227-231, 2019.
- SNIJDERS, P.J.F.; VAN DEN BRULE, A.J.F.; SCHRIJNEMAKERS, H.J.F.; SNOW, G.; MEIJER, C.J.L.M.; WALBOOMERS, J.M.M. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. **J. Gen. Virol.**, v.71, p.173–181, 1990.
- SOPER, D. E. Bacterial Vaginosis and Surgical Site Infections. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 223, n. 3, p. 219-223, 2020.
- STOUT, M. J.; WYLIE, T. N.; GULA, H.; MILLER, A.; WYLIE, K. M. The Microbiome of the Human Female Reproductive Tract. **Current Opinion in Physiology**, v. 13, p. 87-93, 2020.
- SUEHIRO, T. T. et al. Association of human papillomavirus and bacterial vaginosis with increased risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesions. **Int J Gynecol Cancer**. v. 29, p. 242–249, 2019.
- SZOSTEK, S.; ZAWILI_NSKA, B.; BIERNAT-SUDOLSKA, M; KOPE_C, J.; KŁESZCZ, E.; KOPRYNIA, M.; ROJEK-ZAKRZEWSKA, D.; KOSZ-VNENCHAK, M. Differences in the expression of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6 oncogene mRNA in SiHa cell line inoculated with CMV, HSV or ureaplasmas. **Folia Biologica**, v. 62, n.1, 2014.

TACHEDJIAN, G. et al. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus species* in vaginal health. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9–10, p. 782–792, 2017.

TAYLOR-ROBINSON, D. Mollicutes in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium*. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9-10, p. 875-881, 2017.

VERTERAMO, R. et al. Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. **BMC Infect. Dis.** v. 9, n.16, 2009.

VOORDE, J. V.; BALZARINI, J. & LIEKENS, S. Mycoplasmas and Cancer: Focus on nucleoside metabolism. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 300-322, 2014.

YE, H. et al. Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 297, n. 6, p. 1377-1387, 2018.

ZERLOTTI, L. B.; FREITAS, M. R.; RIBEIRO, M.; ABREU, M. C.M.; OLIVEIRA, C. J.F.; RODRIGUES, W. F.; MIGUEL, C.B.; PALUDO, R. L. R. Epidemiologia de exames e mortalidade presuntivos à infecção pelo papiloma vírus humano. **RBAC**. v. 50, n. 2, p. 124-129, 2018.

Recebido em: 03/02/2022

Aprovado em: 05/03/2022

Publicado em: 10/03/2022