

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

**Caracterização da microbiota vaginal, intestinal e oral
durante o período gestacional.**

Luiz Gustavo Sparvoli

Tese para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Taddei de Castro Neves

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

**Caracterização da microbiota vaginal, intestinal e oral
durante o período gestacional.**

Luiz Gustavo Sparvoli

Versão Original

Tese para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Taddei de Castro Neves

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S736c Sparvoli, Luiz Gustavo
Caracterização da microbiota vaginal, intestinal e oral durante o período gestacional. / Luiz Gustavo Sparvoli. - São Paulo, 2019.
87 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Taddei, Carla

1. Mulher. 2. Gestação. 3. Microbioma. 4. Múltiplos sítios . 5. Sequenciamento do gene 16S rRNA. I. T. II. Taddei, Carla, orientador.

Luiz Gustavo Sparvoli

**Caracterização da microbiota vaginal, intestinal e oral
durante o período gestacional.**

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do Título de Mestre

Prof.^a Dr.^a Carla Taddei de Castro Neves

orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2019

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Dedicatória

À minha mãe,

Maria Lúcia Pereira Sparvoli,

Por ter me dado a vida, por ter lutado por mim desde o primeiro momento da minha existência, por todo o carinho e amor que me transmite, por sempre estar me incentivando a continuar e enfrentar as adversidades para atingir meus objetivos com respeito ao próximo e coragem. Obrigado por todo o amor e sacrifício que tem por mim, eu te amo com todas as forças.

Ao meu pai,

Álvaro José Sparvoli,

Por todo o seu trabalho e sacrifício para nos proporcionar o melhor que fosse possível, por ter me ensinado a ser um homem sensível e honesto e a respeitar as pessoas pelo o que elas são e não pelo que têm. Aprendi a entender seu jeito de me amar e sou grato por ser meu pai, te amo muito.

À minha irmã,

Ana Carolina,

Por toda sua luta e coragem de prosseguir mesmo com todas as suas dificuldades que me inspiraram a continuar e a enfrentar a vida com a cabeça erguida. Obrigado por ser a minha melhor amiga, cúmplice e apoiadora nestes anos todos, você é uma das minhas razões de lutar, te amo.

RCC, você me dedicou seu carinho e amor em momentos onde eu achei que estava sozinho, me impulsionou a atravessar as tristezas com perseverança e tranquilidade, obrigado por ser meu companheiro, amigo e confidente. Te amo.

Agradecimentos

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo, por ter proporcionado a oportunidade de desenvolver este trabalho de pós-graduação.

À Profa. Dra. Carla Taddei, por ter me orientado com dedicação, por todas as sugestões, conselhos, compreensão e pelo apoio sempre dado durante esses últimos anos.

À Profa. Dra. Silvia Daher, por ter auxiliado no projeto e disponibilizado acesso a coleta das amostras.

Ao Prof. Dr. Sandro Rogerio de Almeida, coordenador do programa de pós-graduação, pelo apoio, pelas orientações e ajuda na conclusão deste trabalho.

Aos professores, médicos e enfermeiros da Escola Paulista de Medicina da Unifesp e dos Ambulatórios do Hospital São Paulo.

À Samanta Luiza Carvalho de Sá, secretária da pós-graduação do departamento, pelas diversas vezes que foi solicitada em nos ajudar e esclarecer nossas dúvidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Aos companheiros de Laboratório, Amanda Mota, Cilicia Silvério, Luana Moreira e em especial a Ramon Cortez, meu grande amigo, por todo o companheirismo, auxílio, orientações e por toda a amizade que me dedicou nestes dois anos em que nos conhecemos e compartilhamos tristezas e alegrias.

Resumo

SPARVOLI, L. G. Caracterização da microbiota vaginal, intestinal e oral durante o período gestacional. 2019. 87f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A simbiose desenvolvida entre seres vivos e microrganismos desempenha um importante papel na relação saúde-doença do hospedeiro. Neste sentido, o corpo humano abriga uma grande e diversa comunidade de microrganismos, sendo as mucosas vaginal, intestinal e oral as principais superfícies mucosas do corpo feminino que abrigam as comunidades bacterianas de fundamental importância para a mulher. Estes microrganismos atuam no desenvolvimento e modulação do sistema imune, na manutenção e otimização de vias metabólicas e competem por sítios de colonização, prevenindo que microrganismos patogênicos estabeleçam colonização. A composição da microbiota feminina varia com a idade, pH, secreção hormonal, ciclo menstrual, uso de anticoncepcional e atividade sexual. O presente estudo buscou caracterizar a composição da microbiota do corpo feminino durante o período gestacional, comparando os achados entre gestantes e não gestantes saudáveis, através de técnicas de biologia molecular. Foram selecionadas 60 mulheres saudáveis para o estudo e coletadas amostras de secreção vaginal, fezes e *swab* oral de cada participante. O DNA das amostras foi extraído e submetido à sequenciamento do gene *16S rRNA* e quantificado através da técnica de PCR em tempo real. Das participantes selecionadas, 42 eram gestantes e 18 eram mulheres não gestantes em idade reprodutiva. Observamos que a quantificação total de bactérias na vagina não apresentou diferenças entre gestantes e não gestantes. Houve aumento na abundância de *Lactobacillus* no sítio vaginal, bactérias produtoras de butirato na microbiota intestinal e *Streptococcus* na microbiota oral de mulheres grávidas quando comparadas com mulheres não gestantes. Além disso, observamos que a composição e a disposição dos gêneros encontrados sofrem uma modificação, tal como aumento de gêneros relacionados com a manutenção da homeostase no grupo de mulheres gestantes. O período gestacional influencia positivamente na composição da microbiota, garantindo assim a prevalência de gêneros bacterianos responsáveis pela manutenção das condições ideais para o desenvolvimento da gestação saudável.

Palavras chaves: mulher, gestação, microbioma, múltiplos sítios, sequenciamento do gene *16S rRNA*.

Abstract

SPARVOLI, L. G. Vaginal, gut and oral microbiota characterization during pregnancy 2019. 87f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The symbiosis developed between living organisms and microorganisms plays an important role in the health-disease relationship of the host. In this sense, the human body harbor a large and diverse community of microorganisms, the vaginal, intestinal and oral mucosa are the main mucosal surfaces of the female body that harbor bacterial communities of fundamental importance for women. These microorganisms act in the development and modulation of the immune system, in the maintenance and optimization of metabolic pathways and compete for colonization sites, preventing pathogenic microorganisms from establishing colonization. The composition of the female microbiota varies with age, pH, hormonal secretion, menstrual cycle, contraceptive use and sexual activity. The present study aimed to characterize the microbiota composition of the female body during the gestational period, comparing the findings between healthy and non - pregnant women through molecular biology techniques. Sixty healthy women were selected for the study and samples of vaginal secretion, stool and oral swab from each participant were collected. The DNA of the samples was extracted and submitted to the *16S rRNA* gene sequencing and quantified by the real-time PCR technique. Were select, 42 were pregnant and 18 were non-pregnant women of reproductive age. We observed that the total quantification of bacteria in the vaginal samples did not present differences between pregnant and non-pregnant women. There was an increase in the abundance of *Lactobacillus* in the vaginal site, butyrate producing bacteria in the intestinal microbiota and *Streptococcus* in the oral microbiota of pregnant women when compared to non-pregnant women. In addition, we observed that the composition and arrangement of the genera found undergo a modification, such as an increase in genera related to the maintenance of homeostasis in the group of pregnant women. The pregnancy influences the composition of the microbiota, thus ensuring the prevalence of bacterial genera responsible for the maintenance of the ideal conditions for the development of healthy pregnancy.

Key words: women, pregnancy, microbiome, multiple site, *16s rRNA* gene sequencing.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
1.1 Microbiota.....	10
1.2 Microbiota vaginal.....	11
1.3 Microbiota intestinal.....	13
1.4 Microbiota oral.....	15
2. Justificativa.....	16
3. Objetivos.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. Materiais e Métodos.....	19
4.1. Pacientes.....	19
4.2. Extração do DNA das amostras.....	20
4.3. Quantificação por PCR em tempo real.....	21
4.3.1. Curvas Padrão.....	21
4.3.2. Quantificação dos microrganismos.....	22
4.4 PCR qualitativo.....	23
4.5. Sequenciamento do gene <i>16S rRNA</i>	24
4.5.1. Obtenção dos amplicons.....	24
4.5.2. Purificação do produto de PCR.....	24
4.5.3. Anexo dos adaptadores.....	25
4.5.4. Purificação dos amplicons anexados.....	25
4.6. Análises.....	27
4.6.1 Análise estatística.....	27
4.6.2 Análise das sequencias obtidas por bioinformática.....	27
4.6.3 Análise dos resultados da bioinformática (alfa e beta diversidade).....	28
4.6.4 Classificação das espécies.....	29
5. Resultados.....	30
5.1. Análise do perfil sociodemográfico.....	30
5.2. Quantificação de bactérias totais nas amostras de secreção vaginal.....	31
5.3 Quantificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> em amostras de secreção vaginal.....	32
5.4. Sequenciamento do gene <i>16S rRNA</i>	35
5.4.1. Análise da taxa de abundância relativa.....	35
5.4.2 Alfa e Beta Diversidade.....	50
6. Discussão.....	54
7. Conclusão.....	62
8.Referências.....	64
9 Anexos.....	77

Lista de ilustrações

Figura 1: Microbiota vaginal das participantes não gestantes que usaram anticoncepcional oral.....	31
Figura 2: Quantificação de bactérias totais nos grupos.....	32
Figura 3. Curva de quantificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> em gestantes. Pontos vermelhos representam as leituras de curva padrão da corrida, pontos azuis representa as leituras em triplicata da amostra considerada positiva para <i>S. agalactiae</i> , e os pontos verdes representam as leituras consideradas negativa para essa espécie nas amostras de secreção vaginal.....	33
Figura 4. Gel da PCR qualitativa – amostras 41 e 42 com resultado negativo, controles positivos com bandas de 153 pares de bases (C+1 e C+2), controle negativo (C-) e marcadores de peso molecular 1kb plus (L).....	34
Figura 5: Prevalência de <i>Streptococcus agalactiae</i> baseado nos resultados das culturas de secreção vaginal.....	35
Figura 6: HeatMap dos Filos bacterianos encontrados na microbiota vaginal em mulheres não gestante e gestantes.....	37
Figura 7: Principais gêneros bacterianos encontrados na microbiota vaginal em cada participante.....	39
Figura 8: Espécies bacterianas compartilhadas encontradas nas análises da microbiota em amostras de secreção vaginal entre os dois grupos.....	41
Figura 9: HeatMap dos Principais Filos bacterianos encontrado na microbiota intestinal entre as participantes.....	43
Figura 10: Principais gêneros bacterianos encontrados na microbiota intestinal em cada participante.....	45
Figura 11: HeatMap do principais Filos bacterianos encontrados na microbiota oral em cada participante.....	47
Figura 12: Principais gêneros bacterianos encontrados na microbiota oral em cada participante.....	49
Figura 13: Alfa diversidade. A, D e G- índice de Chao 1, B, E e H - índice de Shannon e C, F e I - índice de Simpson das amostras vaginais, intestinais e orais, respectivamente.....	51
Figura 14: Coordenadas principais (PCoA) onde medidas ponderadas estão à esquerda e não ponderadas a direita. a- sítios; b- amostras vaginais; c- amostras intestinais e d- amostras orais.....	53

Lista de tabelas

Tabela 1. Iniciadores e sondas.....	23
Tabela 2. Características clínicas dos grupos de gestantes e não gestantes.....	30
Tabela 3. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos Filos bacterianos encontrados.....	36
Tabela 4. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos principais gêneros bacterianos encontrados.....	38
Tabela 5. Abundância relativa das principais espécies bacterianas encontradas na microbiota vaginal de não gestantes e gestantes.....	40
Tabela 6. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos principais Filos bacterianos encontrados em amostras intestinais.....	42
Tabela 7. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos principais gêneros bacterianos encontrados em amostras intestinais.....	44
Tabela 8. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos principais Filos bacterianos encontrados em amostras orais.....	46
Tabela 9. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos principais gêneros bacterianos encontrados em amostras orais.....	48

Lista de abreviaturas

DNA: *Desoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

EPM-UNIFESP: Escola Paulista de Medicina

g: grama

HPV: Papiloma vírus humano

IMC: Índice de massa corpórea

Kg: quilograma

μl: microlitro

mM: mili Molar

mL: mililitro

OTU: Unidade Operacionais Taxonômicas

PBS: Tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)

PCoA: Análise de Coordenadas Principais

PCR: Reação de polimerização em cadeia (*polymerase chain reaction*)

QIIME: *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* RNA: RNA ribossomal

qPCR: Reação de polimerização em cadeia quantitativa

rRNA: *Ribosomal ribonucleic acid* (ácido ribonucleico ribossomal)

1. Introdução

1.1 Microbiota

O corpo humano abriga uma comunidade de microrganismos simbióticos que estão envolvidos em diversos processos vitais à saúde. (TURNBAUGH et al., 2007) Sua colonização inicia-se no útero materno e durante o parto a carga inicial de microrganismos herdada desempenha um papel importante na vida da criança e é influenciada pela interação de diversos fatores internos e externos, incluindo a via de parto, (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010) nutrição por aleitamento materno ou fórmula láctea, (CAICEDO et al., 2005) introdução de alimentos sólidos, (FALLANI et al., 2011) colonização ambiental, dieta, (DE FILIPPO et al., 2010) uso de antibióticos, (TANAKA et al., 2009) etnia e localização geográfica. (GUPTA; PAUL; DUTTA, 2017) O primeiro ano de vida do indivíduo estabelece uma janela de adaptação e remodelamento da comunidade microbiana, havendo assim um aumento da diversidade e enriquecimento da comunidade bacteriana na criança e a transição de um perfil individual desta comunidade para a vida adulta. (EGGESBØ et al., 2011; PALMER et al., 2007) A aquisição de determinadas espécies de bactérias e a manutenção da comunidade bacteriana dependerá, em parte, de interações ambientais do hospedeiro, destacando a qualidade da água consumida, interações interpessoais e a alimentação. (BLASER; FALKOW, 2009)

A microbiota exerce uma influência essencial na modulação do sistema imune do hospedeiro, além de desempenhar funções como a produção de substâncias antimicrobianas, síntese de vitaminas, digestão de carboidratos e proteção contra a invasão de microrganismos patogênicos, através da competição por sítios de adesão. (WANG et al., 2017) A relação entre o hospedeiro e a microbiota afeta a plasticidade fenotípica e a expressão gênica, onde através da interação de ácidos graxos de cadeia curta, derivados da fermentação de carboidratos complexos, com receptores específicos da proteína G acoplada (GPR) -41 e -43 (BROWN et al., 2003), inibem a ação de histonas deacetilase influenciando diretamente a expressão de genes pelas células do hospedeiro. (WALDECKER et al., 2008) Desta forma, determinados fenótipos serão expressos e interferirá diretamente nos processos de saúde e doença do hospedeiro. (Sharon et al 2014 e Younes et al., 2018) Esta íntima relação depende de um equilíbrio entre as trocas ocorridas entre microbiota e o hospedeiro, e alterações na proporção e composição dos microrganismos presentes podem acarretar em situações patológicas ou predisposição à algumas patologias. Da mesma forma, essas alterações também podem ser favoráveis no tratamento ou controle de situações patológicas. (CLEMENTE et al., 2016)

1.2 Microbiota vaginal.

As características histológicas da vagina propiciam um ambiente ideal para a proliferação de microrganismos. Seu epitélio consiste em três camadas: mucosa, muscular e camada adventícia. Neste epitélio, o muco produzido é proveniente de glândulas presentes na cérvix uterina, já que em sua composição não estão presentes glândulas produtoras de muco. Em mulheres adultas, o epitélio vaginal apresenta-se estratificado e pavimentoso, conferindo ao órgão proteção contra agressões físicas e invasão de patógenos, auxiliando a manutenção da umidade vaginal e na produção de substâncias, como o glicogênio. (THOMPSON et al., 2001) Além de produzir uma grande quantidade de glicogênio na fase estrogênica do ciclo menstrual e durante a gestação, esse epitélio é responsável por armazená-lo e liberá-lo para a luz vaginal durante a descamação do epitélio. O glicogênio liberado sofrerá a ação de amilases produzidas por células epiteliais presentes na vagina sendo, então, clivado em maltose e glicose, servindo de substrato para bactérias que habitam a vagina. (MIRMONSEF et al., 2014)

A composição da microbiota feminina varia com a idade, produção hormonal, ciclo menstrual, uso de medicamentos e atividade sexual. Evidências mostram que a composição da microbiota é importante para a saúde reprodutiva e do trato genital. (YOUNES et al., 2018) Como tal, a gravidez é uma condição onde várias adaptações fisiológicas (alterações imunológicas, hormonais e metabólicas) ocorrem para permitir o desenvolvimento fetal adequado, mantendo a saúde materna. (CLEMENTE et al., 2016) Alterações na composição da microbiota são observadas à medida que a gravidez progride, especialmente na microbiota vaginal. (TADDEI et al., 2018)

A composição da microbiota vaginal é caracterizada pela presença de diversos microrganismos fermentadores devido as características ambientais da vagina. (HICKEY et al., 2012) O gênero *Lactobacillus* é o gênero mais predominante encontrado em mulheres saudáveis em idade reprodutiva, compreendendo cerca de 85% da comunidade bacteriana vaginal. As principais espécies presentes na vagina são *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. iners*. (YOUNES et al., 2018) A predominância de *Lactobacillus* na microbiota vaginal de mulheres saudáveis é um marcador importante para a saúde do trato genital feminino já que os mesmos são os principais responsáveis pela fermentação láctica ocorrida. A produção de lactato garante a acidificação do pH vaginal criando assim ambiente ótimo para a reprodução de *Lactobacillus* e inibindo o desenvolvimento de gêneros patogênicos como *Gardnerella*, *Atopobium* e *Prevotella* presentes na microbiota (MILLER et al., 2016)

Durante o período pré-menarca e climatério, a produção dos hormônios esteroides encontra-se diminuída, o que implica em um aumento do pH vaginal gerando, assim, diminuição da abundância de *Lactobacillus* presentes na vagina e favorecendo a colonização por *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Escherichia*. Esses gêneros, assim como *Gardnerella*, *Atopobium* e *Prevotella*, estão presentes como colonizadores da microbiota vaginal, podendo ser relacionados com situação de disbiose, em situações onde a prevalência de *Lactobacillus* está diminuída, desestabilizando as características bioquímicas do epitélio, como descritos anteriormente (GODHA et al., 2018).

As alterações que o organismo materno sofre durante a gestação ocorrem, em grande maioria, graças ao aumento do feto e suas necessidades e, principalmente, pela constante produção de estrogênio e progesterona ocorrida durante a gestação (TAN, K. & TAN, 2013). Os sistemas mais alterados pela gestação são os sistemas cardiovascular, renal, respiratório, hematológico, gastrointestinal e endócrino (TAN, K. & TAN, 2013). Devido a influência do estrogênio e da progesterona, o epitélio vaginal espessa-se, devido ao acúmulo e a produção constante de glicogênio, além de também estar aumentada a descamação do mesmo neste período, fazendo com que haja um aumento das secreções vaginais. Além disso, a influência de tais hormônios resulta no aumento da vascularização vaginal (Soma-Pillay, Nelson-Piercy, Tolppanen, 2016).

O glicogênio liberado durante o período gestacional tem importante papel na abundância e manutenção de *Lactobacillus* na mucosa vaginal. *Lactobacillus* desempenham um importante papel na imunidade vaginal, além de serem responsáveis pela produção de ácido láctico, desta forma o aumento na abundância de *Lactobacillus* garante a manutenção do baixo pH local tornando assim a vagina inóspita para potenciais patógenos (DIGIULIO et al., 2015). Em geral, a composição da microbiota vaginal tende a apresentar uma grande abundância de *Lactobacillus* que aumenta e permanece mais estável à medida que a gravidez progride, no entanto, há alta variabilidade inter-individual, além do enriquecimento de outros gêneros como os pertencentes aos Filos Actinomycetes e Bacteroidetes (PELZER et al., 2017).

Os *Lactobacillus* vaginais mais frequentes são os *L. crispatus* e *L. iners*. *L. crispatus* é considerado mais benéfico do que *L. iners*, uma vez que está associado a menor prevalência de infecções sexualmente transmissíveis (PETROVA et al., 2013).. Além disso, em contraste com outros *Lactobacillus* vaginais, *L. iners* é frequentemente encontrado nas composições de microbiota vaginal disbiótica, ou seja, desequilibrada, e o seu papel benéfico tem sido debatido.

(DE BACKER et al., 2007; VAN DE WIJGERT et al., 2014). Condições específicas como as de mulheres portadoras do Papiloma Vírus Humano (HPV) geram padrões característicos de microbiota. Por exemplo, estas mulheres possuem uma microbiota vaginal mais diversa, cujas espécies predominantes são *L. gallinarum*, *L. iners*, *L. gasserie* e *Gardnerella vaginalis*; em mulheres saudáveis, as espécies mais comuns são *L. crispatus*, *L. jensenii*, e *L. gasseri* (GAO et al., 2013; LIN et al., 2018). Há ainda uma grande discrepância de resultados na literatura acerca do real envolvimento destas espécies em situações de eubiose e disbiose. Alguns autores sugerem que essas relações ocorrem devido às características químicas da molécula de ácido láctico produzido por diferentes espécies de *Lactobacillus* (BOSKEY et al., 2001).

No entanto, *Lactobacillus iners* quando expostos a situações adversas como a disbiose, são capazes de recorrer a estratégias de sobrevivência como a alteração de sua expressão genica. Alguns trabalhos demonstram que em situações de alcalinização do pH vaginal *Lactobacillus iners* é capaz de aumentar a expressão de genes envolvidos no sistema de transporte da maltose além de também aumentarem a expressão de glicerol quinase e glicerol-3-phosphato desidrogenase enzimas que permitem a clivagem do glicogênio tornando possível sua utilização em vias glicolíticas (MACKLAIM et al., 2013), consequentemente otimizando a obtenção energética por *Lactobacillus iners* frente as situações disbiótica. Estas características permitem sua adaptação à micro- ambientes desfavoráveis para o seu desenvolvimento (BORGDORFF et al., 2016). Neste sentido, pode-se argumentar que a tolerância de *L. iners* a mudanças na composição e no pH vaginal refletem sua adaptação para o sítio vaginal tornando-o a bactéria pioneira na mudança de um microambiente disbiótico para um perfil eubiotico, através da acidificação do pH vaginal (BORGDORFF et al., 2016; DE BACKER et al., 2007; KINDINGER et al., 2017).

O controle de infecções genitais durante a gestação está associado a prevenção de trabalho de parto prematuro e, desta forma, a manutenção de um status eubiótico da microbiota vaginal tem sido associada à saúde genital e reprodutiva feminina.

1.3 Microbiota intestinal.

Assim como o ocorrido na microbiota vaginal, a microbiota intestinal desempenha papéis fundamentais para a saúde do indivíduo, dentre os quais estão a modulação da imunidade local e sistêmica, regulação e adaptação metabólica, além de afetar as adaptações fisiológicas

que ocorrem durante a gravidez (GOHIR; RATCLIFFE; SLOBODA, 2015). A composição do epitélio intestinal é organizada de forma a compor uma barreira permeável responsável por isolar a luz intestinal do interior do corpo (Lance & Artis 2014). A luz intestinal é coberta por uma espessa camada de muco, dividida em camada interna e externa. A interna, mais próxima ao epitélio, é comumente colonizada por uma baixa densidade de bactérias, devido à alta capacidade imunológica da lâmina própria (SICARD et al., 2017). As bactérias que habitam o intestino colonizam a camadas de muco mais externa, formando uma comunidade bacteriana caracterizada majoritariamente pela presença de uma comunidade transitória, ou seja, colonizam de forma temporária, enquanto que a camada interna de muco abriga apenas microrganismos residentes, que estabelecem colonização permanente com o hospedeiro (Lance & Artis, 2014; Jiang, W. et al 2015).

A comunidade de microrganismos presente no intestino humano é composta por uma grande diversidade de bactérias, (FLINT et al., 2012) e sua composição não está totalmente esclarecida devido à enorme influência que os fatores externos e internos do hospedeiro exercem, como a colonização inicial herdada após o nascimento, características genéticas, resposta imunológica, uso de antibióticos ou probióticos e costumes alimentares. Mas, de forma geral os gêneros bacterianos mais prevalentes encontrados na microbiota intestinal em mulheres saudáveis são *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Prevotella* e *Eubacterium* (CORTEZ et al., 2018a; KONSTANTINOV; VAN DER WOUDE; PEPPELENBOSCH, 2013). Trabalhos recentes mostram uma prevalência de 90% das principais espécies encontradas pertencentes aos Filos Bacteroidetes e Firmicutes em indivíduos com perfis homeostáticos (D Mariant et al., 2009). A relação entre estes dois Filos vem sido descrita como um marcador de qualidade para a saúde intestinal, sendo associados com padrões mais eubióticos e participando diretamente no perfil metabólico dos indivíduos (KOVATCHEVA-DATCHARY; ARORA, 2013).

Beta-glucuronidase e beta-glucuronides são enzimas produzidas por algumas espécies bacterianas presentes na microbiota intestinal capazes de atuar na conjugação e desconjugação do estrogênio presente nas fezes. A ação destas enzimas interfere diretamente nas concentrações de estrogênio disponíveis na circulação entero-hepática e desta forma participam na regulação dos níveis de estrogênio circulante e excretado. Sendo assim, podemos destacar a participação da comunidade bacteriana intestinal envolvida no balanço dos níveis de estrogênios no organismo feminino (BAKER; AL-NAKKASH; HERBST-KRALOVETZ, 2017; PLOTTEL; BLASER, 2011). A manutenção do equilíbrio dos níveis de estrogênio está ligada com um trato reprodutivo saudável, e o desenvolvimento de neoplasias ginecológicas já foi anteriormente

relacionado ao desequilíbrio dos níveis sistêmicos de estrogênio (HOMMA et al., 2004; PLOTTEL; BLASER, 2011).

A composição da microbiota intestinal no primeiro trimestre da gestação é semelhante àquela observada em mulheres não grávidas, sendo os principais gêneros observados *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Prevotella* e *Eubacterium* (NURIEL-OHAYON; NEUMAN; KOREN, 2016). No entanto, à medida que a gravidez progride, mudanças significativas são observadas e a diversidade aumenta, enquanto a riqueza diminui (KOREN et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que a diminuição da diversidade na microbiota intestinal está associada a um perfil disbiótico, induzindo a produção de marcadores inflamatórios (GOHIR; RATCLIFFE; SLOBODA, 2015). Por sua vez, esse padrão alterado foi associado a diferentes patologias gestacionais como, por exemplo, o diabetes gestacional e a hipertensão gestacional (GOMEZ-ARANGO et al., 2016; KOREN et al., 2012). Trabalhos recentes sugerem que devido às adaptações gestacionais, a microbiota intestinal passa por variações no decorrer da gestação, chegando ao terceiro trimestre com um perfil mais rico em gêneros produtores de ácidos graxos de cadeia curta (FULLER et al., 2015). Isso favorece a manutenção do perfil glicêmico normal tanto em situações fisiológicas como a resistências periférica à insulina ocorrida durante a gestação e em situações patológicas como o diabetes mellitus e o diabetes mellitus gestacional (CORTEZ et al., 2018a) além de também participarem no controle da pressão arterial e em diversos outros eventos mediados por processos inflamatórios (GOMEZ-ARANGO et al., 2016).

1.4 Microbiota oral.

Na mucosa oral existe uma condição semelhante de adaptação microbiana. Assim como o ocorrido no intestino, o ecossistema oral é composto por diversos nichos com diferenças histológicas significativas, entre eles estão a saliva, superfície lingual, mucosa oral e a superfície dos dentes. Estes sítios possuem composições bioquímicas únicas e ótimas para abrigar a comunidade bacteriana (AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009). O papel da microbiota oral está relacionado à proteção contra patógenos e metabolismo, e a maioria dessa comunidade é composta pelos gêneros *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus* e *Prevotella* (ZAURA et al., 2009). O papel do gênero *Streptococcus* na microbiota oral vem sendo frequentemente discutido, entretanto estudos recentes apontam que a diminuição do gênero na microbiota oral estaria associada com o frequente aparecimento de infecções na boca e superfície dentária sendo

este gênero tido como determinante para a definição de eubiose oral (BELDA-FERRE et al., 2012). As situações de desequilíbrio entre os microrganismos dessa comunidade tornam o indivíduo extremamente suscetível ao surgimento de doenças infecciosas orais, além de estarem relacionadas a doenças sistêmicas como o diabetes e doenças cardiovasculares.

O papel da microbiota oral na patogênese dos cânceres orais não está completamente claro, inicialmente discutia-se que a presença das bactérias provocava uma resposta inflamatória crônica onde a presença dos mediadores inflamatórios produzidos nestes processos provocaria ou facilitaria a proliferação celular, mutagênese e ativação da oncogênese (LIM et al., 2017). Atualmente a teoria discutida aponta para a participação direta da comunidade bacteriana na patogênese dos cânceres orais, a produção de proteínas efetoras bacterianas através dos sistemas de secreção tipo 3 e 4 estaria relacionada a distúrbios na proliferação celular, desarranjos do citoesqueleto das células do hospedeiro, ativação do fator nuclear kappa B e inibição da apoptose celular estimulando o desenvolvimento de células cancerosas (VOGELMANN; AMIEVA, 2007; ZHANG et al., 2018).

Não são muitos os trabalhos que se dedicaram a estudar a relação entre a gestação e a microbiota oral, entretanto a constante produção de estrogênio e progesterona parecem influenciar este sítio do organismo, tornando maior o número de bactérias presentes na boca. (FUJIWARA et al., 2017) A disbiose no trato oral facilita o desenvolvimento de periodontites crônicas na gravidez, levando à liberação de diversas citocinas e mediadores inflamatórios, associadas a patologias obstétricas diferentes, como o trabalho de parto prematuro, abortamentos de recorrência e pré-eclâmpsia (MARQUES-ROCHA et al., 2015; MEURIC et al., 2017).

2. Justificativa

Nosso conhecimento sobre a interação entre as diferentes comunidades de microrganismos presente no corpo humano, em especial como se comportam frente aos eventos gestacionais são poucos, entretanto, nos últimos anos estudos foram publicados relatando a composição da microbiota em diferentes locais do corpo de mulheres saudáveis: gestantes e não gestantes. No entanto, quase todas essas investigações avaliaram a comunidade de um único sítio (vaginal, intestinal ou oral); muitos avaliaram apenas mulheres não grávidas, enquanto outros compararam o perfil da microbiota encontrado em gestantes saudáveis com os achados em um grupo de pacientes com alguma doença obstétrica específica (COBB et al., 2017;

EDWARDS et al., 2017). Considerando estas observações e o importante papel desempenhado pela microbiota no processo reprodutivo, pretendemos avaliar paralelamente a microbiota vaginal, intestinal e oral de gestantes saudáveis e compará-los com os achados em mulheres em idade fértil saudáveis e não grávidas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é a caracterização da microbiota vaginal, intestinal e oral de mulheres no período reprodutivo.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a microbiota vaginal, intestinal e oral de mulheres gestantes e não gestantes usando sequenciamento de nova geração do gene *16S rRNA*;
- Detectar e quantificar a espécie *Streptococcus agalactiae* na microbiota vaginal dos grupos de estudo
- Classificar as principais espécies bacterianas, em especial espécies de *Lactobacillus*, presentes nas amostras vaginais;
- Comparar os resultados obtidos entre os grupos de mulheres gestantes e não gestantes.

4. Materiais e Métodos

4.1. Pacientes

As pacientes foram recrutadas no Ambulatório de Pré-natal Fisiológico da Escola Paulista de Medicina (EPM-UNIFESP) e no Setor de Planejamento familiar, também da Escola Paulista de Medicina (EPM-UNIFESP).

Foram selecionadas mulheres não gestantes e gestantes cursando gestação saudável, em idade reprodutiva (18 a 50 anos). No caso das gestantes, no exame pré-natal do terceiro trimestre de gestação (IG entre 28° e 36° semanas), as pacientes foram submetidas à coleta de secreção do fundo de saco vaginal. Foram selecionadas 42 gestantes no terceiro trimestre de gestação e 18 mulheres não gestantes saudáveis. Aquelas que preencherem os critérios de inclusão e que espontaneamente aceitaram participar do estudo, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram encaminhadas para preenchimento da ficha cadastral e para coleta de material. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CAAE:32609714.8.0000.5505).

A coleta das amostras vaginais do grupo de gestantes foi realizada pelos médicos que as atenderam nos ambulatórios acima citados. A coleta das amostras de fezes foi feita pelas próprias pacientes, que receberam previamente um tubo coletor fecal estéril e orientações para a realizarem as coletas em casa. As mulheres foram orientadas a armazenarem as fezes em freezer -20° até o retorno da consulta, algumas horas depois da coleta, e transportadas em um isopor com gelo. As amostras orais foram obtidas através de coleta oral com *swab* seco e estéril no mesmo dia. A coleta das amostras vaginais de mulheres não gestantes também foi realizada por médicos dos ambulatórios acima, já para as amostras de fezes o material foi coletado em casa pelas próprias participantes seguindo as mesmas orientações e procedimentos adotados para a coleta de gestantes. Para a coleta das amostras orais de mulheres não gestantes foi usado um *swab* seco e estéril onde a coleta foi realizada no mesmo momento em que as participantes concordaram em participar do estudo.

Foram excluídas do estudo pacientes que apresentaram patologias crônicas ou gestacionais, pré-existentes ou diagnosticadas durante o pré-natal, tais como diabetes mellitus (tipo 1, 2 e/ou gestacional), doenças autoimunes sistêmicas, infecções agudas ou crônicas ativas e gestantes que passaram por transplantes de órgãos e ainda se encontravam sob uso de medicações pós-transplante. As amostras foram imediatamente acondicionadas em gelo e transportadas sob congelamento até o Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de

Ciências Farmacêuticas da USP. As amostras foram aliquotadas e mantidas sob congelamento a -80°C até o momento do uso.

4.2. Extração do DNA das amostras

-Amostras de secreção vaginal e oral.

As amostras de secreção vaginal e secreção oral foram submetidas à técnica de extração de DNA usando o kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®)* para extração de DNA de fluidos corporais e sangue. As amostras foram retiradas do freezer -80°C e deixadas à temperatura ambiente. Após o descongelamento das amostras, os *swabs* contendo os materiais coletados foram lavados com 200 μl de tampão fosfato-salino (PBS) estéril, a fim de obter toda a secreção aderida nos *swabs*. Após a lavagem com PBS, foi adicionado em um tubo estéril contendo 20 μl de proteinase K, 200 μl de amostra, 200 μl de tampão de lise AL (*Buffer AL*). Em seguida, cada amostra foi homogeneizada usando *vortex* durante 15 segundos, e, após a homogeneização, os tubos contendo as amostras tratadas com a solução de lise foram encubados à temperatura de 56°C por 10 minutos, a fim de otimizar o processo de lise. Após a encubação, foram adicionados 200 μl de etanol absoluto, e as amostras foram novamente homogeneizadas por 15 segundos. Então, a mistura foi colocada em tubos contendo colunas, e centrifugados a 8000 rpm por 1 minuto. Em seguida, as colunas foram submetidas às lavagens onde, em um primeiro momento, foram adicionados 500 μl do tampão de lavagem AW1 (*Buffer AW1*) e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto, e, em seguida, a segunda lavagem foi realizada acrescentando-se 500 μl de tampão de lavagem AW2 (*Buffer AW2*), centrifugando a 14000 rpm por 3 minutos. Até esse momento, todo o material coletado foi desprezado e o DNA extraído foi mantido nas colunas.

Para a recuperação do DNA, as colunas foram cuidadosamente retiradas dos tubos coletores e recolocadas em tubos de 1,5 μl limpos e estéreis, a fim de coletar o DNA proveniente das colunas. Em seguida, foram adicionados 100 μl de água *MilliQ®* estéril, e os tubos foram encubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 3 minutos, e o DNA extraído foi armazenado à -20°C até o momento do uso.

-Amostras de fezes

As amostras de fezes foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit *QiaAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen®)*. Foi adicionado 1,4ml de tampão de lise ASL (*Buffer AL*) no tubo contendo 0,2g de amostra de fezes. As amostras foram então homogeneizadas utilizando *vortex* e então encubadas a 90°C durante 10 minutos em seguida centrifugadas por 1 minuto para a precipitação das partículas de fezes. Em seguida, foi pipetado 1,2ml do sobrenadante para um novo tubo de 2ml e adicionado um tablete de *Inhibitex®* para cada amostra, na sequência foram homogeneizados até a dissolução do tablete de *Inhibitex®*. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 3 minutos para precipitar os inibidores ligados ao *Inhibitex®*.

Foram adicionados 200µl do sobrenadante em um tubo estéril contendo 15µl de proteinase K e na sequência novamente foi adicionado o tampão de lise AL (*Buffer AL*) usando 200µl devolume. As amostras foram então homogeneizadas e encubadas a 70°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µl de etanol absoluto nos tubos contendo o lisado das amostras e foram homogeneizadas por 15 segundos. Então, a mistura foi colocada em tubos contendo colunas, e centrifugados a 8000 rpm por 1 minuto. Em seguida, as colunas foram submetidas às lavagens onde, em um primeiro momento, foram adicionados 500 µl do tampão de lavagem AW1 (*Buffer AW1*) e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto, e, em seguida, a segunda lavagem foi realizada acrescentando-se 500 µl de tampão de lavagem AW2 (*Buffer AW2*), centrifugando a 14000 rpm por 3 minutos. Para recuperação do DNA, a coluna foi transferida para um tubo estéril de 1,5mL e adicionou-se à coluna 100µl de água *MilliQ®*. A amostra foi então centrifugada por 5 minutos, o tubo contendo o DNA resultante eluído foi então armazenado a temperatura de -20°C até o momento do uso.

4.3. Quantificação por PCR em tempo real

4.3.1. Curvas Padrão

Para obtenção do DNA bacteriano usado para a construção das curvas das bactérias a serem quantificadas (*E. coli* e *S. agalactiae*), foi usado 1 ml da fase log de crescimento das culturas das bactérias selecionadas. Para a extração do DNA genômico, foi utilizado o *kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®)*, e as condições adotadas foram as mesmas recomendadas pelo fabricante (FURET et al., 2009).

Diluições seriadas de concentrações conhecidas do DNA genômico de cada uma das bactérias a serem quantificadas foram usadas na construção das curvas. Uma curva padrão foi construída para cada um dos microrganismos a serem quantificados. Para o controle negativo das reações, foi adotado o uso de água *MilliQ*® estéril.

Para a quantificação das bactérias totais foi eleito o DNA de *E. coli* ATCC 25922 para construção da curva padrão, uma vez que o número de cópias do gene *16S rRNA* para bactérias totais é definido por uma média geral entre as diferentes espécies de bactérias pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A cepa foi cultivada em caldo Luria-Bertani (LB) preparado no laboratório e encubada por 24 horas à 37°C.

A construção da curva de *Streptococcus agalactiae* foi feita usando o DNA genômico extraído de cepas ATCC 13813. As cepas foram cultivadas em placas de ágar sangue por 24 horas à 37°C.

4.3.2. Quantificação dos microrganismos

A reação de PCR em tempo real foi realizada com o equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*®). As reações para as quantificações de bactérias totais foram realizadas com a metodologia de *TaqMan*®, com os iniciadores e sondas específicos para uma região conservada do gene *16S rRNA*, permitido assim ser usado como referência para quantificação do total de bactérias, iniciadores e sondas descritos na Tabela 1 (FURET et al., 2009). Para o gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus agalactiae*, o método realizado foi o sistema *SYBR*® *Green I*, com iniciadores descritos na Tabela 1 (JESPERS et al., 2012; NATARAJAN et al., 2006). A escolha dos iniciadores para a quantificação foi realizada a partir da análise em publicações prévias (Tabela 1). As reações foram realizadas em triplicatas, e para os sistemas *TaqMan*® e *SYBR*® foram usadas concentrações de iniciadores de 200nM e 400nM, respectivamente. O volume final de 20 µl foi adotado, dos quais 3 µl são de DNA extraído das secreções vaginais e o volume restante composto por *mix*, iniciadores e sonda.

Para as reações que usaram o sistema *TaqMan*®, as condições adotadas foram as seguintes: desnaturação por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. Para o sistema *SYBR*® *Green I* as reações foram realizadas nas mesmas condições de amplificação, seguidas da curva de *melting* (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C).

Tabela 1. Iniciadores e sondas

Bactéria	Iniciadores e Sondas	Sequência 5'-3'	Referência
	F_Bact 1369	5' CGG TGA ATA CGT TCC CGG 3'	
Bactérias Totais	R_Prok 1492	5' TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T 3'	
	P_TM 1389F	5' 6FAM-CTT GTA CAC ACC GCC CGT C 3'	Furet et al, 2009
<i>Streptococcus agalactiae</i>	streptoFw	5' TTTCACCAGCTGTATTAGAAGTA 3'	
	dltRAS	5' GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT 3'	Girija Nataajna et al, 2017

4.4 PCR qualitativo

Para a confirmação da presença de DNA de *Streptococcus agalactiae* nas amostras, foi realizada uma reação da polimerase em cadeia. Para essa reação foi usado 2 ul de buffer 10 vezes, 0,8 ul de cloreto de magnésio, 1,6 ul de DNTP, 0,2 ul de Taq DNA Polimerase Platinum (*Thermo Fisher Scientific*®), 0,8 ul de cada iniciador de *S. agalactiae* (Tabela 1) e 2 ul de DNA de cada amostra. O volume foi de 20ul e foi completado com água *MilliQ*® estéril.

Após o preparo das reações, os tubo contendo as reações foram levados ao equipamento *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* sob as seguintes condições: foram submetidas a 95°C por 1 minuto, em seguida foram realizados 30 ciclos onde as temperaturas foram 95°C por 45 segundos para a desnaturação, 57°C por 45 segundos para a extensão e 72°C por 45 segundos para o anelamento do DNA por fim as amostras ficaram por 7 minutos sob a temperatura de 72°C, após este período permaneceram a 4°C até o momento de uso. Para a averiguação dos resultados foi usado 1 µl de cada produto de PCR em gel de agarose com concentração de 1% por 45 minutos em eletroforese sob tensão de 120 volts.

4.5. Sequenciamento do gene *16S rRNA*

Para o preparo da biblioteca *16S rRNA* do sequenciamento, foram usados iniciadores específicos para a amplificação da região V4 do gene *16S rRNA* (KLINDWORTH et al., 2013):

- 16S Forward Primer

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

- 16S Reverse Primer

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC
C.

Durante o preparo da biblioteca adotamos como padrão as recomendações e o protocolo disponibilizados pela fabricante (Illumina® - 16S *Metagenomic Sequencing Library Preparation*)

4.5.1. Obtenção dos amplicons

Para obtenção dos amplicons, 2,5 µl do DNA genômico extraído das amostras a uma concentração de 5 ng/µl foi submetido a uma reação de PCR, e nestas reações foram usados 5 µl dos iniciadores para a região V4 do gene *16S rRNA* (citados acima) em concentrações iguais a 1 µM, 0,2 µl de Taq DNA polimerase Accuprime (*Thermo Fisher Scientific*®), 2,5 µl de tampão da enzima e 9,8 µl de água *MilliQ*® estéril. As condições de corridas foram as seguintes: 95° por 3 minutos para a ativação da enzima, seguidos de 25 ciclos para a desnaturação do DNA por 30 segundos. A temperatura de anelamento adotada foi 55°C por 30 segundos, extensão 72°C por 5 minutos e mantidos a 4°C até a retirada da placa do termociclador. Para a averiguação da obtenção do tamanho esperado do fragmento, aproximadamente 412 pb, foi utilizado 1ul do produto da reação de PCR em gel de agarose a 1% submetido à eletroforese por 45 minutos sob tensão de 120 volts.

4.5.2. Purificação do produto de PCR

Após a obtenção dos amplicons, os produtos de PCR foram submetidos a uma purificação usando o sistema de *beads* magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter Agencourt Beads). Foi adicionado 20 µl de *beads* em cada poço da placa de PCR, na sequência a placa foi encubada por 5 minutos em temperatura ambiente, com o auxílio de uma estante magnética a

placa foi encubada por 2 minutos, ou até que a total separação das *beads* do sobrenadante estivesse ocorrido.

Ainda com o auxílio da estante magnética, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, a lavagem das *beads* foi realizada adicionando-se 200 µl de etanol 80% em cada amostra; na sequência a placa foi encubada no suporte magnético por 30 segundos a temperatura ambiente, então o sobrenadante foi removido cuidadosamente. A lavagem com etanol foi repetida posteriormente da mesma forma. Com a placa seca ainda no suporte magnético, as *beads* foram encubadas, expostas ao ar, por 10 minutos a fim de secá-las completamente.

Após a secagem, a placa foi então retirada do suporte magnético, e, com o auxílio de uma pipeta, adicionou-se 52,5 µl de Tris 10 mM (pH 8,5) em cada amostra. Após homogeneizar o material, a placa foi encubada a temperatura ambiente por 2 minutos, e então colocada novamente na estante magnética por mais 2 minutos. Por fim, com o auxílio de uma pipeta transferiu-se cuidadosamente 50 µl do sobrenadante para uma nova placa de PCR.

4.5.3. Anexo dos adaptadores

Os amplicons purificados foram ligados a um par de índices e adaptadores de sequenciamento Illumina® presentes no kit Nextera XT index kit. Foram transferidos para uma placa de PCR nova 5 µl de cada amostra da placa após o processo de purificação. Na nova placa, adicionou-se 5 µl do Index Primer 1 (N7xx), 5 µl do Index Primer 2 (S5xx), 1,3 µl de Taq DNA polimerase accuprime, 5 µl de accuprime tampão da enzima e 28,7 µl de água MilliQ® estéril. A reação foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos para a ativação enzimática, seguidos de 8 ciclos de desnaturação 95°C por 30 segundos, a temperatura de anelamento usada foi 55°C por 30 segundos, extensão à 72°C por 30 segundos, 72°C por 5 minutos e mantidos a 4°C. Após o anexo dos adaptadores, o produto da reação foi submetido à eletroforese e “revelado” em gel de agarose a 1% para garantir que os adaptadores foram devidamente anexados.

4.5.4. Purificação dos amplicons anexados

Um segundo processo de purificação usando o sistema de beads magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter Agencourt Beads) foi realizado para garantir maior qualidade durante o processo de sequenciamento. Com o auxílio de uma pipeta multicanal, foi adicionado 40 µl das

esferas AMPure XP para cada amostra na placa de PCR, na sequência homogeneizou-se as amostras com as *beads* e encubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos, a placa então foi colocada em uma estante magnética por 2 minutos, ou até que a total separação das *beads* do sobrenadante estivesse ocorrido.

Ainda com a placa na estante magnética, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, a lavagem das foi realizada adicionando-se em cada amostra 200 µl de etanol 80%; ainda com a placa sobre o suporte magnético encubou-se por 30 segundos, e então o sobrenadante foi removido cuidadosamente. A lavagem com etanol foi repetida posteriormente da mesma forma. Ainda com a placa sobre o suporte magnético, as *beads* foram encubadas, expostas ao ar, por 10 minutos a fim de secá-las completamente.

Após a secagem, a placa foi então retirada do suporte magnético, e, com o auxílio de uma pipeta, adicionou-se 27,5 µl de Tris 10mMpH 8,5 em cada amostra na placa. Após homogeneizar o material, a placa foi encubada a temperatura ambiente por 2 minutos, e então colocada novamente na estante magnética por mais 2 minutos. Por fim, com o auxílio de uma pipeta transferiu-se cuidadosamente 25 µl do sobrenadante para uma nova placa de PCR. Novamente o gel de eletroforese foi realizado para averiguar a eficiência do processo de purificação.

Após a segunda purificação, as amostras foram quantificadas usando equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer e kit de quantificação Qubit dsDNA BR Assay Kit, e, a partir desta quantificação, as mostras foram diluídas para a concentração ideal de 4nM para a elaboração de um *pool* com as bibliotecas. A biblioteca final e um kit de sequenciamento Miseq Reagent kit v2 (500 ciclos) foram encaminhados para o sequenciamento no equipamento Illumina® Miseq pelo Centro de Facilidade e Apoio a Pesquisa da USP. Lá, as bibliotecas presentes no *pool* foram desnaturadas com hidróxido de sódio, diluídas com tampão de hibridização a uma concentração final de 15pM, e então novamente desnaturadas com o uso de calor antes do sequenciamento MiSeq. A corrida incluiu 20% de PhiX para servir como um controle interno para essas bibliotecas de baixa diversidade.

4.6. Análises.

4.6.1 Análise estatística

As validações estatísticas das quantificações foram realizadas inicialmente usando o programa Excel, onde os valores dos ciclos threshold (Ct) obtidos através das reações de qPCR foram utilizados na equação da reta gerada pelo equipamento a partir das curvas padrões construídos. As correções necessárias foram realizadas, de acordo com as diluições feitas durante as extrações (ALTERMANN et al., 2005; DURFEE et al., 2008). O número de cópias obtidos foi devidamente convertido para o valor de unidades formadoras de colônias por mililitros e representadas por valor em logaritmo de base 10. Após a conversão dos valores para unidades formadoras de colônia em logaritmo de base 10, os valores foram validados através do teste de Mann-Whitney performado pelo *software GraphPad Prism, v7.0 pra Windows®*.

Para a averiguação e confirmação de diferença estatística da abundância relativa e alfa diversidade das sequencias, também foi usado o *software GraphPad Prism, v7.0 pra Windows®*. Onde após a normalização dos dados e de acordo com a necessidade para cada tipo de dado foram realizados os testes χ^2 , Mann-Whitney, teste t de Student. Além disso, a fim de avaliar como os diferentes gêneros bacterianos se comportaram em comunidade, foi realizado teste de correlação entre os mesmos.

4.6.2 Análise das sequencias obtidas por bioinformática

O resultado obtido das bibliotecas *16S rRNA* pelo sequenciamento foram avaliadas por bioinformática usando o software QIIME v.1.9.1 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). O software QIIME foi utilizado para remover as sequências de *barcodes* e de primer, assim como retirar artefatos quiméricos, efetuar o alinhamento das sequências, a construção da matriz de distância, o agrupamento das (OTUs) e a construção da árvore filogenética, assim como para avaliar os índices de diversidade e os testes de hipóteses. Primeiramente, as sequencias foram filtradas de forma a remover os *barcodes* e as sequencias de primer, em seguida uma segunda filtragem das sequências foi realizada, a fim de remover as leituras menores do que aproximadamente 400 pares de bases. Após a realização das filtrações, foi realizada uma busca por artefatos quiméricos, onde as sequências identificadas como quiméricas foram excluídas. As sequências das bibliotecas remanescentes foram agrupadas em OTUs, baseando-se em similaridade de 99%, contra o banco de dados Silva versão 128

(QUAST et al., 2013), este banco de dados possui aproximadamente 370.000 sequências de bactérias e *Archaea* pré-alinhadas. Cada biblioteca teve seus respectivos índices de alfa e beta diversidade calculados, onde a análise faz referência à variedade e complexidade de espécies em uma comunidade.

4.6.3 Análise dos resultados da bioinformática (alfa e beta diversidade)

Alfa diversidade analisa a composição das diferentes espécies em unidades de amostragem, geralmente em escala local (WHITTAKER, 1972). Desta forma, a análise da alfa diversidade determina quais espécies foram observadas e quantos tipos diferentes de espécies estão presentes nestes ambientes.

Foram utilizados diferentes métricas e índices para a avaliação da alfa diversidade neste estudo:

- índice de Shannon que se trata de uma métrica para descrever a abundância e a uniformidade da comunidade observada. Avalia o grau de incerteza em prever a soma da proporção de cada espécie em relação ao número total das espécies na comunidade estudada (SHANNON, 1948);

- índice de Simpson que avalia o grau de dominância da comunidade, sendo assim reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos por acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie (PYLRO et al., 2014);

- índice de riqueza de Chao1 que estima o número total de espécies presentes em uma comunidade (CHAO A, 1984)

- Diversidade filogenética de Faith que refere-se ao comprimento total mínimo de todos os ramos filogenéticos necessários para abranger um determinado conjunto de taxa na árvore filogenética (FAITH; BAKER, 2006).

- OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) é o conjunto de sequências agrupadas com base em semelhanças e que podem ou não ser equivalentes a entidades taxonômicas, por exemplo espécies, gêneros, etc. (JOVEL et al., 2016).

A Beta diversidade leva em consideração a diferença na comunidade e na composição bacteriana de diferentes ecossistemas (WHITTAKER, 1972). Foi realizado o teste de hipótese UniFrac com a finalidade de estabelecer as semelhanças e diferenças entre as comunidades

(LOZUPONE; KNIGHT, 2005). Este teste analisa estatisticamente as diferenças estruturais das comunidades bacterianas, baseando-se no tamanho dos ramos de uma árvore filogenética compartilhada entre duas ou mais comunidades. A Análises de Coordenadas Principais (PCoA) foi utilizada como método de ordenação, baseando-se nas matrizes de distância filogenéticas Unifrac ponderada e não ponderada (NAVAS-MOLINA et al., 2013). Os valores de frações únicas, Unifrac ponderada, consideram a abundância relativa de OTUs presentes na comunidade (LOZUPONE et al., 2007; NAVAS-MOLINA et al., 2013) já os valores UniFrac não ponderada considera a observação ou a ausência de OTUs referentes a espécies raras, (LOZUPONE; KNIGHT, 2005; NAVAS-MOLINA et al., 2013).

A validação estatística e a criação dos gráficos das coordenadas principais (PCoA) foram performados usando o *software MicrobiomeAnalyst*. (DHARIWAL et al., 2017)

4.6.4 Classificação das espécies

A classificação das espécies foi realizada utilizando o software SPINGO (*Species-level Identification of metaGenOmic amplicons*), comparando as sequencias obtidas no processo de sequenciamento com um banco de dados conhecido, RDP (*Ribosomal Database Project*). Para tanto, o software identifica sequencias únicas de espécies específicas presente no gene *16S rRNA* para atribuir as respectivas classificações.

5. Resultados

5.1. Análise do perfil sociodemográfico

Foram incluídas 60 pacientes no estudo, dentre as quais 18 foram mulheres não grávidas saudáveis e 42 gestantes saudáveis e cursando o terceiro trimestre de gestação. A tabela 2 apresenta as principais características sociodemográficas e clínicas das pacientes incluídas no estudo. Os grupos apresentaram diferença significativa entre si quanto à etnia, sendo 63,63% das gestantes pardas e 72,22% das não gestantes brancas. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa quanto à idade (29,11 +/- 1,0 x 27,45 +/- 1,3) e IMC (23,2 +/- 2,4 x 25, 2 +/- 4,1, respectivamente).

Tabela 2. Características clínicas dos grupos de gestantes e não gestantes.

Variáveis		Gestantes	Não gestantes	Valor de p ^a
Raça	Branca	16 (38.1%)	13 (72.22%)	0.016*
	Parda	21 (50%)	2 (11.11%)	
	Negra	5 (11.9%)	3 (16.67%)	
IMC (Kg/m ²)	Min-Max	17.4 – 37.8	20.96 – 30.77	0.047**
	Mediana	26.52	22.77	
	Intervalo interquartilico	21.81 – 29.04	21.48 – 24.25	
Idade (anos)	Min-Max	19 – 44	18 – 38	0.56***
	Média (Desvio padrão)	28.24 (5.68)	29.11 (4.25)	

IMC: índice de massa corpórea; * teste χ^2 ; ** teste Mann-Whitney; *** teste t de Student; ^a significante quando < 0,05.

A fim de melhor observar os fatores individuais que pudessem influenciar na composição e interação da microbiota das participantes, destacamos o uso de anticoncepção hormonal pelas participantes não gestantes. Entre as participantes não gestantes, 63% faziam uso de anticoncepcional hormonal regularmente, e 37% não fazia uso de anticoncepcionais hormonais. (Figura 1) Observamos uma grande abundância do gênero *Lactobacillus* associada a menor diversidade dos gêneros na microbiota vaginal de mulheres que usavam anticoncepcional oral no momento da coleta das amostras. No grupo de mulheres que não faziam uso de anticoncepcional, pudemos observar baixa abundância de *Lactobacillus*, e maior abundância relativa dos gêneros *Gardnerella*, *Atopobium* e *Shuttleworthia*. (Figura 1)

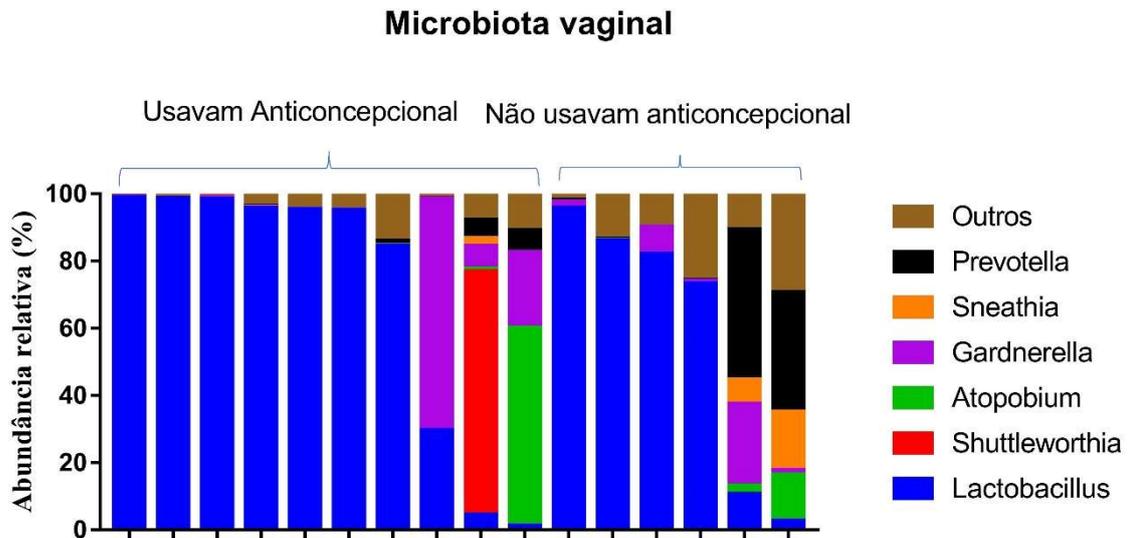


Figura 1: Microbiota vaginal das participantes não gestantes que usaram anticoncepcional oral.

5. 2. Quantificação de bactérias totais nas amostras de secreção vaginal

A quantificação de bactérias totais entre os grupos foi expressa em UFC/ml de secreção vaginal. No ensaio de PCR em tempo real para a quantificação de bactérias totais, todas as amostras tiveram amplificação, e algumas amostras tiveram amplificação acima do ponto máximo da curva padrão. Estas amostras foram diluídas em diluição 1:100, e as devidas correções para os cálculos de quantificação exata foram feitas. Na comparação dos grupos gestantes e mulheres não gestantes em idade reprodutiva (Figura 2) foi observado um valor médio em ambos os grupos, onde os valores de bactérias totais presente na microbiota vaginal tende a manter-se estável mesmo com a grande mudança ecológica proporcionada pela gestação no ambiente vaginal.

Não foram observadas alterações no valor total de bactérias presentes na microbiota vaginal de gestantes quando comparado com não gestantes (8,7 +/-0,7 x 8,8 +/- 0,7, respectivamente).

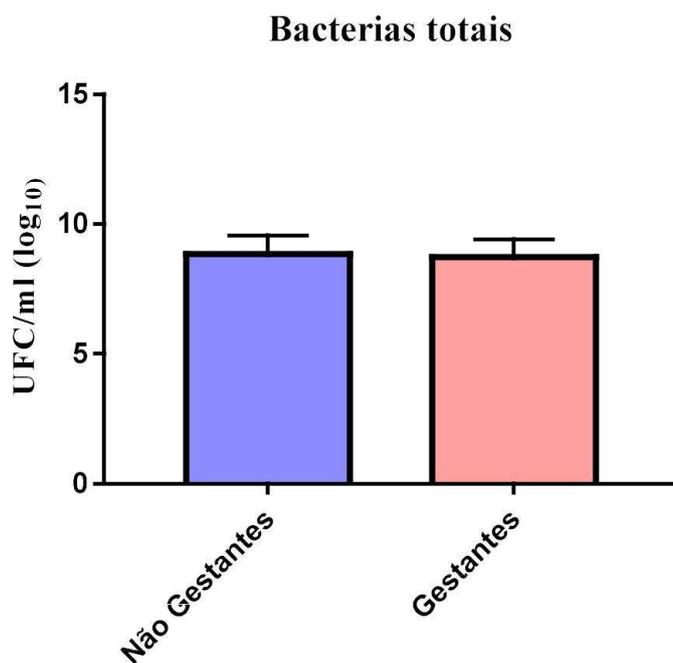


Figura 2: Quantificação de bactérias totais nos grupos

5.3 Quantificação de *Streptococcus agalactiae* em amostras de secreção vaginal

As amostras de secreção vaginal de mulheres gestantes e não gestantes não apresentaram quantidades detectáveis de *S. agalactiae* no PCR quantitativo, como observado na figura 3, uma vez que essas amostras amplificam um sinal abaixo de 1 cópia de DNA de *S. agalactiae*. No grupo gestante, apenas uma amostra foi positiva sendo a concentração obtida nesta amostra de 2,97 UFC em log₁₀.

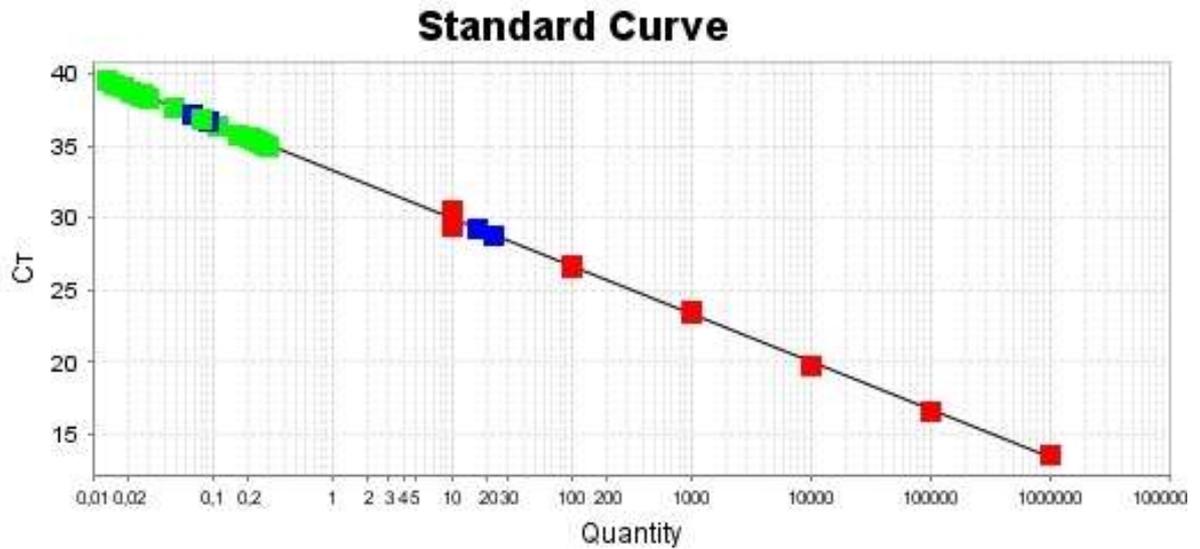


Figura 3. Curva de quantificação de *Streptococcus agalactiae* em gestantes. Pontos vermelhos representam as leituras de curva padrão da corrida, pontos azuis representa as leituras em triplicata da amostra considerada positiva para *S. agalactiae*, e os pontos verdes representam as leituras consideradas negativa para essa especie nas amostras de secreção vaginal.

Para confirmar a negatividade das amostras, fizemos um PCR qualitativo, utilizando os respectivos iniciadores descritos na tabela 1 (Figura 4), o qual confirmou a ausência de bandas para *S. agalactiae* nas amostras estudadas, com exceção de uma amostra de gestante (0,04%), corroborando os dados do PCR quantitativo mostrado na Figura 3.

Para o ensaio de PCR qualitativo foram incluídos como controles positivos o DNA de *Streptococcus agalactiae* de duas culturas diferentes (C+1 e C+2), ambos com amplificação de bandas de 153 pares de bases, além de um controle negativo onde água estéril foi usada como controle (C-). Estes controles foram incluídos com a finalidade de garantir a detecção correta da banda e correta performance do ensaio. Os mesmos padrões de controles foram usados para ambos, ensaios de secreção vaginal de gestantes e de não gestantes.

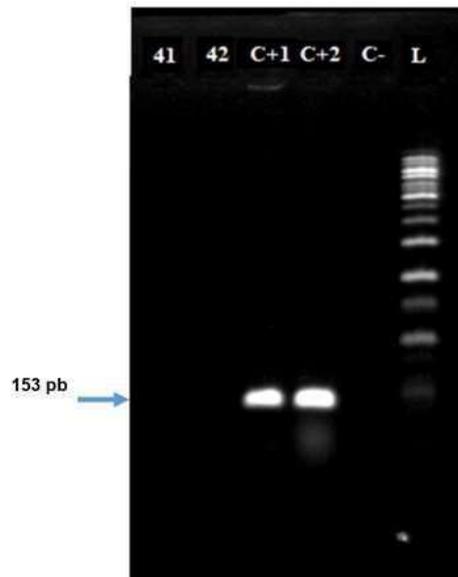


Figura 4. Gel da PCR qualitativa para *S. agalactiae* – amostras 41 e 42 com resultado negativo, controles positivos com bandas de 153 pares de bases (C+1 e C+2), controle negativo (C-) e marcadores de peso molecular 1kb plus (L).

A fim de relacionar esses dados com os achados clínicos das gestantes, avaliamos os exames de cultura de secreção vaginal para *Streptococcus agalactiae* das gestantes realizadas nos ambulatórios de Pré-natal Fisiológico da Escola Paulista de Medicina (EPM-UNIFESP) e no Setor de Planejamento familiar, também da Escola Paulista de Medicina (EPM-UNIFESP). Entre as amostras vaginais incluídas neste estudo, 12% tiveram resultados positivos, 68% tiveram resultado negativo e 20% destas pacientes não realizaram o exame (Figura 5).

Gráfico de prevalência de *S. agalactiae*.



Figura 5: prevalência de *Streptococcus agalactiae* baseado nos resultados das culturas de secreção vaginal

5.4. Sequenciamento do gene *16S rRNA*

5.4.1. Análise da taxa de abundância relativa

O gene *16S rRNA* das amostras de secreção vaginal, fezes e secreção oral foram sequenciados e as taxas de abundância relativa das bactérias foi criada com relação aos principais Filos e gêneros encontrados, um corte mínimo de 1% foi adotado para seleção dos Filos e gêneros mais observados.

-Amostras vaginais.

Analisando a abundância relativa de Filos na microbiota vaginal em cada grupo, observou-se o predomínio do Filo Firmicutes em ambos os grupos, embora este tenha sido maior no grupo gestante em comparação ao grupo não gestante (89,2% x 97,7%, $p = 0,10$). Os outros Filos predominantes foram Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria, embora nestes casos fossem menores no grupo de gestantes (Bacteroidetes 1,0 x 0,5, $p = 0,10$; Proteobacteria 0,4 x 0,3, $p = 0,50$ e Actinobacteria 1,8 x 0,4, $p = 0,06$) (Tabela 3).

Tabela 3. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos Filos bacterianos encontrados.

Microbiota Vaginal (Filos)		Gestante	Não gestante	P ^a
<i>Firmicutes</i>	Min-Max	24,6 - 99,6	9,9 - 99,5	0,1
	Mediana	97,5	89,2	
	Intervalo interquartílico	94,55 - 99,0	30,2- 98,6	
<i>Bacteroidetes</i>	Min-Max	0 - 7,5	0,1 - 46,1	0,1
	Mediana	0,5	1,0	
	Intervalo interquartílico	0,15 - 0,95	0,1 - 5,6	
<i>Proteobacteria</i>	Min-Max	0 - 3,7	0,1 - 7,8	0,5
	Mediana	0,3	0,4	
	Intervalo interquartílico	0,2 - 0,95	0,2 - 0,7	
<i>Actinobacteria</i>	Min-Max	0,1 - 67,6	0,1 - 81,8	0,06
	Mediana	0,4	1,8	
	Intervalo interquartílico	0,1 - 1,75	0,5 - 17,8	
<i>Fusobacteria</i>	Min-Max	0 - 14,8	0 - 17,3	0,1
	Mediana	0	0	
	Intervalo interquartílico	0 - 0	0 - 0,1	

^a Teste Mann-Whitney

A análise da abundância relativa em relação aos Filos encontrados individualmente nas amostras de cada grupo (Figura 6), evidencia a predominância do Filo Firmicutes nas amostras de mulheres gestantes, entretanto, algumas amostras apresentaram diminuição do Filo Firmicutes e aumento de Filos como Actinobacteria, Bacteroidetes e Fusobacteria. Nas amostras de mulheres não gestantes, observa-se um aumento na abundância de Filos como Proteobacteria, Bacteroidetes e Fusobacterium, quando comparados os resultados com mulheres gestantes.

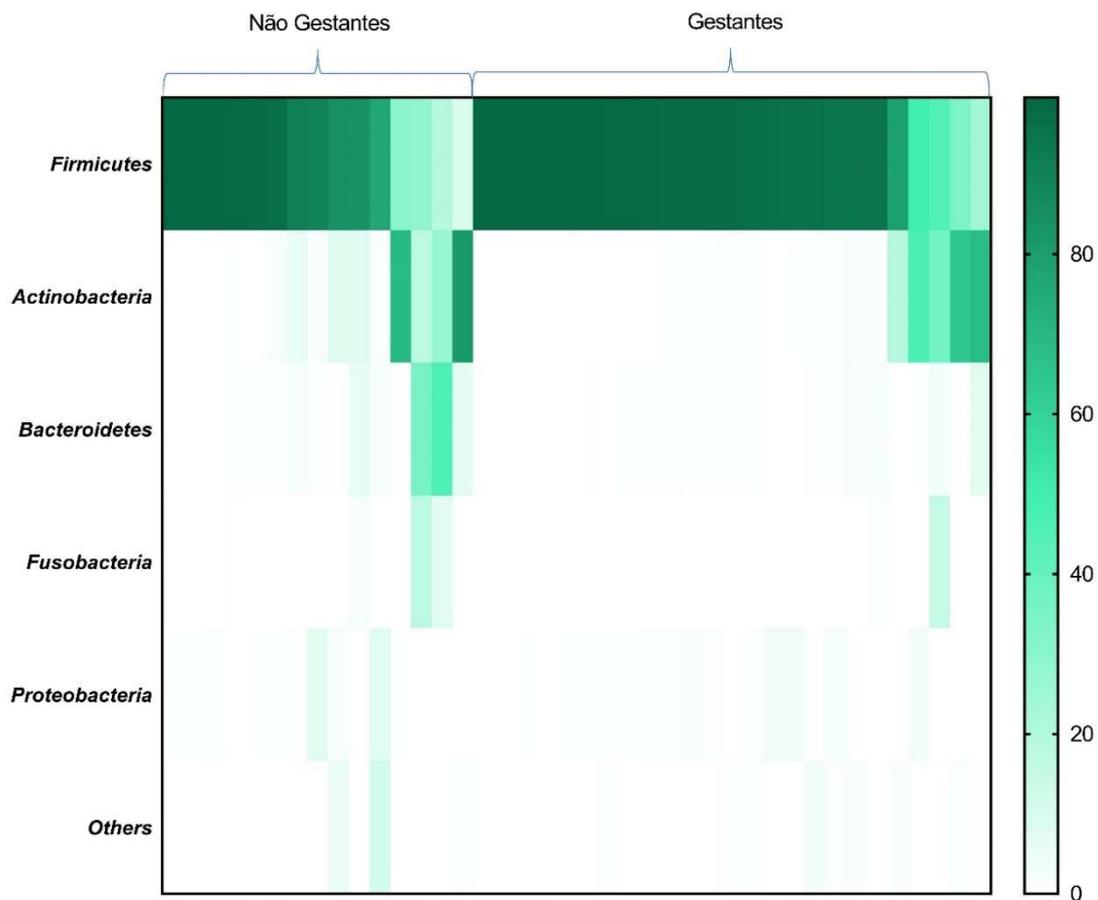


Figura 6: HeatMap dos Filos bacterianos encontrados na microbiota vaginal em mulheres não gestante e gestantes.

Em relação aos gêneros, os resultados mostram uma prevalência de *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium* e *Shuttleworthia* (Tabela 4 e Figura 7). Um aumento na abundância de *Lactobacillus* foi observado no grupo de gestantes, e os gêneros *Prevotella*, *Atopobium* e *Shuttleworthia* apresentam maior abundância no grupo de não gestantes. Apesar das diferenças observadas entre os grupos, os achados observados para *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium* e *Shuttleworthia* não foram estatisticamente significantes ($p= 0,30$; $p= 0,06$; $p= 0,30$ e $p= 0,75$ respectivamente).

Tabela 4. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos principais gêneros bacterianos encontrados.

Microbiota vaginal (Gêneros)		Gestantes	Não gestante	P ^b
<i>Atopobium</i>	Min-Max	0 – 48.7	0 – 58.9	0.31 ^a
	Mediana	0	0	
	Intervalo interquartilico	0 – 0	0 – 0.62	
<i>Prevotella</i>	Min-Max	0 – 7.4	0 – 44.8	0.06 ^a
	Mediana	0	0.3	
	Intervalo interquartilico	0 – 0.5	0.1 – 4.52	
<i>Lactobacillus</i>	Min-Max	1.9 – 99.1	1.1 – 98.8	0.30 ^a
	Mediana	92.5	85.32	
	Intervalo interquartilico	73.1 – 96.7	15.2 – 98.8	
<i>Gardnerella</i>	Min-Max	0 – 64.5	0 – 69	0.06 ^a
	Mediana	0	0.6	
	Intervalo interquartilico	0 – 0.97	0 – 7.7	
<i>Shuttleworthia</i>	Min-Max	0 – 8.5	0 – 72.4	0.75 ^a
	Mediana	0	0	
	Intervalo interquartilico	0 – 0	0 – 0	
<i>Sneathia</i>	Min-Max	0 – 14.7	0 – 17.3	0.14 ^a
	Mediana	0	0	
	Intervalo interquartilico	0 – 0	0 – 0.07	

^a Teste Mann-Whitney

Quando observadas individualmente, as amostras de secreção vaginal, em relação aos principais gêneros encontrados (Figura 7), não se apresentam diferentes dos achados de abundância dos Filos bacterianos. Foi observada uma predominância do gênero *Lactobacillus* nas amostras de ambos os grupos; entretanto, com maior expressividade nas amostras de gestantes. Gêneros como *Shuttleworthia*, *Atopobium* e *Prevotella* apresentam maiores abundâncias individuais em amostras de mulheres não gestantes.

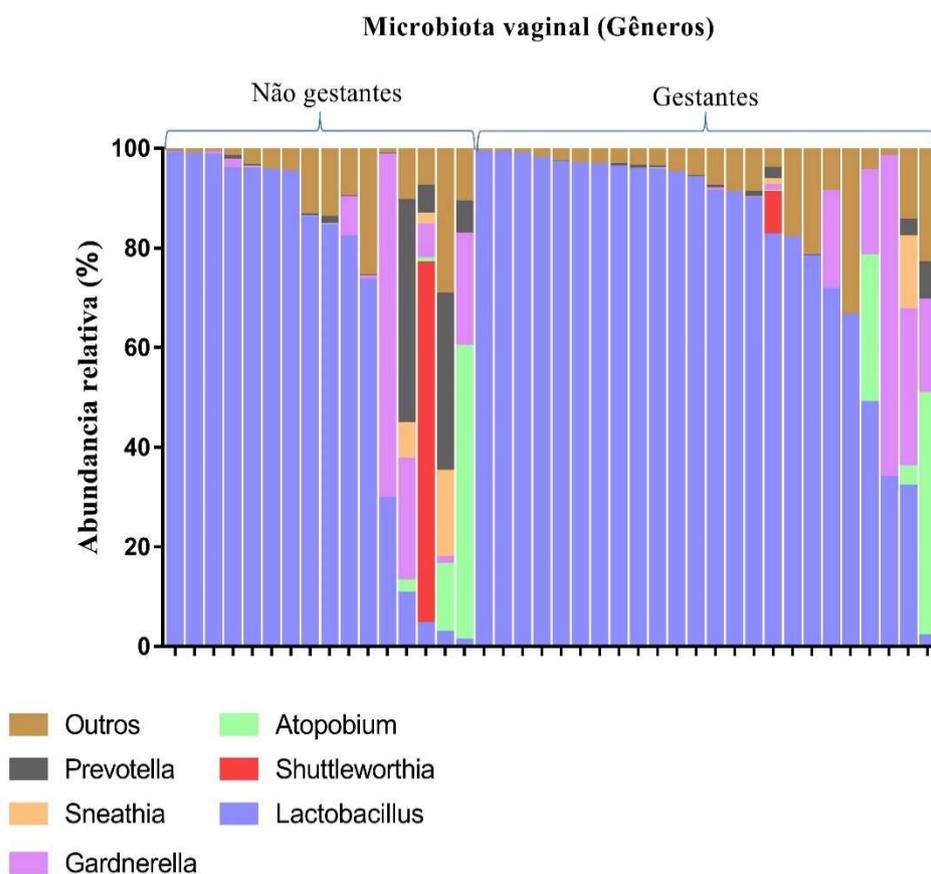


Figura 7: Principais gêneros bacterianos encontrados na microbiota vaginal em cada participante.

Analisando os resultados obtidos da caracterização de espécies, obtivemos a classificação de 55,53% das sequências de não gestantes e 50% das sequências de gestantes. As parcelas não classificadas foram excluídas do total amostral e calculadas as correções para a adequação das quantificações. Em seguida estabelecemos um corte de 0,2% onde apenas as espécies com valor maior ou igual ao corte foram destacadas. Para comparar as espécies entre os grupos foi utilizado o teste t de Student para amostras.

No grupo de gestantes foi observado aumento das espécies de *Lactobacillus iners* e *L. jensenii* na microbiota vaginal em comparação as mulheres não gestantes (78,2% x 35,4%; 11,0% x 2,6%) respectivamente. Associado a isso observamos no grupo gestantes a diminuição das espécies *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella timonensis*, *Atopobium vaginae* e *Sneathia sanguinegens* enquanto que as mesmas espécies estavam aumentadas no grupo de mulheres não gestantes (3,8% x 17,3%; 0,3% x 14,8%; 2,0% x 11,5% e 0,6% x 3,7% respectivamente). (Tabela 5 e Figura 8)

Tabela 5. Abundância relativa das principais espécies bacterianas encontradas na microbiota vaginal de não gestantes e gestantes

Microbiota vaginal (Espécies)	Não gestantes (%)	Gestantes (%)	P ^a
<i>Lactobacillus iners</i>	35,4	78,2	0,22
<i>Gardnerella vaginalis</i>	17,3	3,8	0,36
<i>Prevotella timonensis</i>	14,8	0,3	0,48
<i>Atopobium vaginae</i>	11,5	2,0	0,39
<i>Sneathia sanguinegens</i>	3,7	0,6	0,39
<i>Lactobacillus jensenii</i>	2,6	11,0	0,35
<i>Aerococcus christensenii</i>	2,4	0,5	0,36
<i>Prevotella amnii</i>	2,3	0,2	0,44
<i>Prevotella buccalis</i>	1,7	0,4	0,35
<i>Prevotella bivia</i>	1,1	2,3	0,50
<i>Saccharofermentans acetigenes</i>	0,8	0,0	0,50
<i>Dialister micraerophilus</i>	0,3	0,0	0,50
<i>Mycoplasma hominis</i>	0,3	0,0	0,50
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	0,3	0,0	0,50
<i>Porphyromonas uenonis</i>	0,3	0,0	0,50
<i>Dialister succinatiphilus</i>	0,2	0,0	0,50
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0,2	0,0	0,50
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0,2	0,0	0,50
<i>Prevotella copri</i>	0,0	0,3	0,50
<i>Lactobacillus helveticus</i>	0,0	0,5	0,50
Outros	4,5	2,3	0,19

^a Teste t de Student.

O compartilhamento das espécies nas amostras vaginais dos dois grupos estudados também foi avaliado (Figura 8 foram). Observa-se um compartilhamento de *L. inners*, *L.*

jensenii, *Gardnerella vagonallis*, *Prevotella timonensis* e *Atopobium vaginae*, porém, com distribuições distintas entre gestantes e não gestantes. As espécies de *Lactobacillus iners* e *jensenii* apresentaram aumento da abundância relativa no grupo de gestantes enquanto as espécies *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella timonensis*, *Atopobium vaginae* apresentaram se diminuídas no mesmo grupo. Espécies como *Saccharofermentans acetigenes*, *Dialister micraerophilus*, *Mycoplasma hominis* e *Corynebacterium aurimucosum*, *Corynebacterium aurimucosum*, *Porphyromonas uenonis*, *Dialister succinatiphilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus* não foram observados no grupo gestantes sendo encontrados apenas em não gestantes, e as espécies *Prevotella copri* e *Lactobacillus helveticus* foram exclusivamente observadas em mulheres gestantes. (Figura 8)

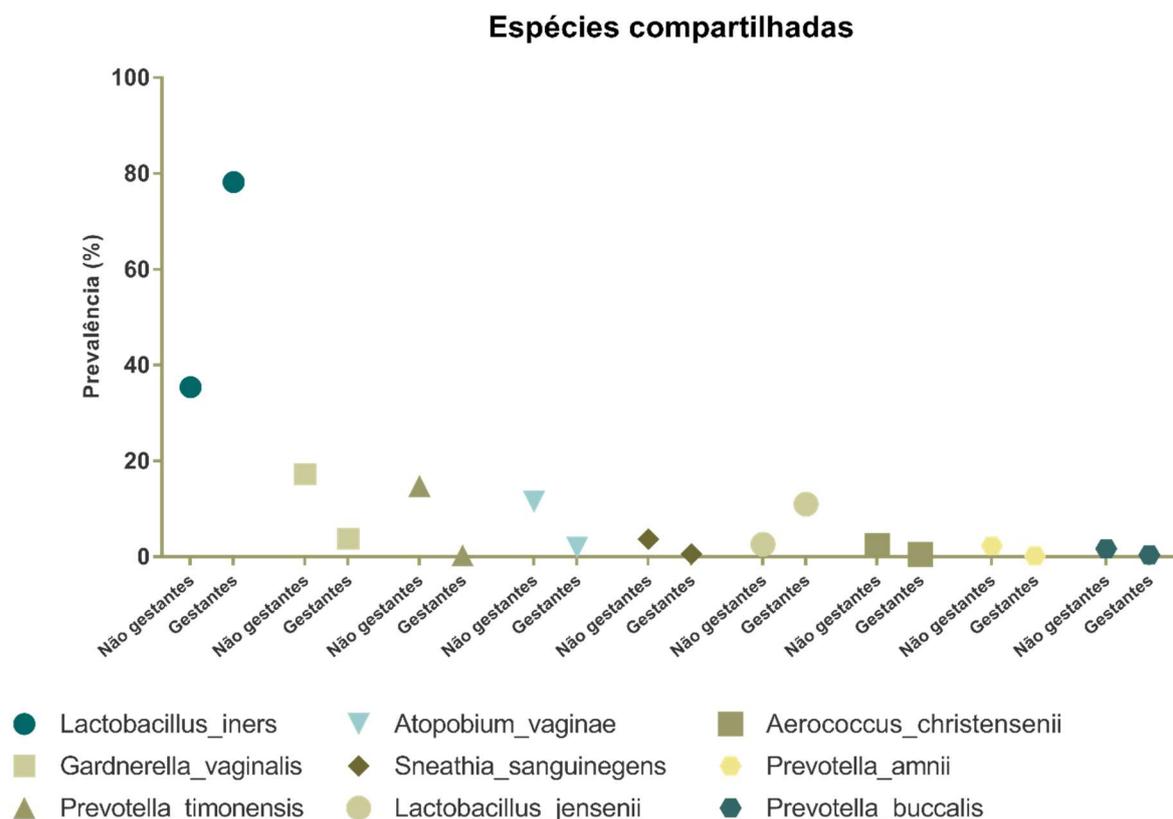


Figura 8: Espécies bacterianas compartilhadas encontradas nas análises da microbiota em amostras de secreção vaginal entre os dois grupos.

-Amostras intestinais

Os perfis da microbiota das gestantes e não gestantes foram semelhantes. Ambos os grupos apresentaram Firmicutes e Bacteroidetes como seus principais Filos, respectivamente. Firmicutes foi menor no grupo de gestantes (51,45 x 47,4, $p = 0,10$), enquanto os valores de Bacteroidetes não variaram entre os grupos. Observamos também diminuição da abundância de Actinobacteria (7,5 x 1,6, $p = 0,37$) e aumento de Proteobacteria (2,6 x 3,4, $p = 0,16$) no grupo gestante. Além disso, a abundância de Verrucomicrobia e Tenericutes foi maior no grupo gestantes (Figura 9 e Tabela 6).

Tabela 6. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos principais Filos bacterianos encontrados em amostras intestinais.

Microbiota intestinal (Filos)		Gestantes	Não gestantes	P ^a
<i>Bacteroidetes</i>	Min-Max	2 - 72.8	12.9 - 69.5	0.70
	Mediana	34.9	34.9	
	Intervalo interquartílico	25.6 - 47.2	18.45 - 47.6	
<i>Actinobacteria</i>	Min-Max	0.1 - 5.9	1.6 - 13.2	0.37
	Mediana	1.6	7.5	
	Intervalo interquartílico	2.7 - 16	0.6 - 2.5	
<i>Proteobacteria</i>	Min-Max	0.7 - 38.4	0.6 - 8.8	0.16
	Mediana	3.4	2.6	
	Intervalo interquartílico	2.3 - 6.2	1.4 - 4.35	
<i>Firmicutes</i>	Min-Max	20.5 - 85.9	27.8 - 83.4	0.10
	Mediana	47.4	51.45	
	Intervalo interquartílico	34.1 - 59.7	47.03 - 69.23	
<i>Tenericutes</i>	Min-Max	0 - 18.0	0 - 10.0	0.29
	Mediana	0.9	0.4	
	Intervalo interquartílico	0 - 4.3	0 - 1.27	
<i>Verrucomicrobia</i>	Min-Max	0 - 29.6	0 - 12.2	0.08
	Mediana	0.5	0.1	
	Intervalo interquartílico	0.1 - 2.4	0 - 1.3	

^a Teste Mann-Whitney; *Significante quando $p < 0,05$

Analisando individualmente as participantes, observa-se que assim como nos demais grupos, a microbiota intestinal tende a ter um perfil único e interindividual marcado pela predominância dos Filos Firmicutes e Bacteroidetes na maioria das participantes. (Figura 9)

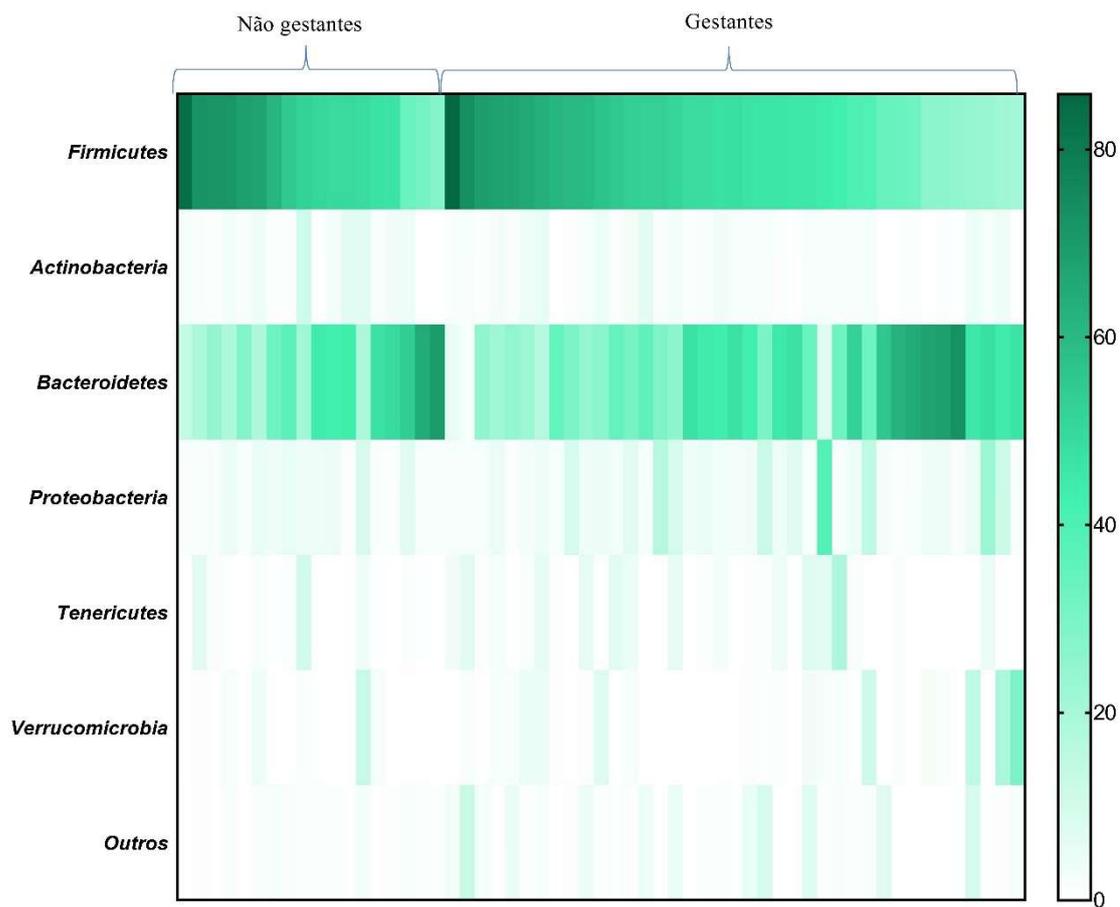


Figura 9: HeatMap dos Principais Filos bacterianos encontrado na microbiota intestinal entre as participantes.

Os principais gêneros encontrados nos dois grupos foram *Bacteroides* e *Ruminococcus*, e as maiores abundâncias foram encontradas no grupo gestante (*Bacteroides* 17,2 x 17,0, $p = 0,90$ e *Ruminococcus* 8,20 x 4,55, $p = 0,28$). O grupo de gestantes também apresentou aumento na abundância de *Akkermansia* e *Christensenellaceae*. Em contraste, um aumento na abundância de *Dialister*, *Eubacterium* e *Roseburia* foi encontrado no grupo não gestante (Figura 10 e Tabela 7).

Tabela 7. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos principais gêneros bacterianos encontrados em amostras intestinais.

Microbiota intestinal (gêneros)		Gestantes	Não gestantes	P ^a
<i>Barnesiela</i>	Min-Max	0 – 9	0 – 3.5	0.75
	Mediana	0.4	0.75	
	Intervalo interquartilico	0 – 2.7	0.07 – 2.25	
<i>Bacteroides</i>	Min-Max	0.4 – 61.2	4.4 – 56.9	0.90
	Mediana	17.2	17.0	
	Intervalo interquartilico	5.9 – 33.7	8.1 – 30.35	
<i>Parabacteroides</i>	Min-Max	0.1 – 8.5	0.1 – 5.4	0.32
	Mediana	1.5	1.95	
	Intervalo interquartilico	0.6 – 1.4	0.87 – 2.72	
<i>Prevotella</i>	Min-Max	0 – 30.6	0 – 20.5	0.50
	Mediana	0.3	0.15	
	Intervalo interquartilico	0 – 3.4	0 – 1.75	
<i>Alistipes</i>	Min-Max	0.1 – 11.3	0.5 – 14.1	0.69
	Mediana	3.2	3.75	
	Intervalo interquartilico	1.4 – 5.8	1.97 – 5.45	
<i>Dialister</i>	Min-Max	0 – 21.2	0 – 20.8	0.90
	Mediana	0.6	0.2	
	Intervalo interquartilico	0 – 4.9	0 – 5.55	
<i>Phascolarctobacterium</i>	Min-Max	0 – 26.1	0 – 11.1	0.52
	Mediana	1.6	1.1	
	Intervalo interquartilico	0.1 – 4.7	0.1 – 2.22	
<i>Eubacterium</i>	Min-Max	0 – 12.3	0 – 21.6	0.13
	Mediana	2.1	3.6	
	Intervalo interquartilico	0.8 – 3.6	1.47 – 6.27	
<i>Subdoligranulum</i>	Min-Max	0 – 12.5	0 – 17.8	0.09
	Mediana	1.2	2.2	
	Intervalo interquartilico	0.5 – 2.6	1.37 – 3.35	
<i>Ruminococcus</i>	Min-Max	0 – 35.2	2.0 – 24.0	0.28
	Mediana	8.2	4.55	
	Intervalo interquartilico	4.2 – 11.4	3.65 – 10.88	
<i>Faecalibacterium</i>	Min-Max	0.3 – 5.4	0.2 – 6.8	0.40
	Mediana	1.0	1.25	
	Intervalo interquartilico	0.5 – 1.9	0.82 – 2.72	
<i>Roseburia</i>	Min-Max	0.0 – 10.5	0.3 – 9.6	0.12
	Mediana	1.4	2.3	
	Intervalo interquartilico	0.6 – 3.1	1.3 – 4.2	
<i>Lachnospiraceae</i>	Min-Max	0.0 – 17.9	0.1 – 9.8	0.94
	Mediana	1.5	0.85	
	Intervalo interquartilico	0.6 – 2.4	0.3 – 3.52	
<i>Christensenellaceae</i>	Min-Max	0.1 – 12.5	0.0 – 15.8	0.74
	Mediana	2.0	1.5	
	Intervalo interquartilico	0.6 – 3.6	0.5 – 3.6	
<i>E. coli/Shigella</i>	Min-Max	0.0 – 20.6	0. – 1.7	0.54
	Mediana	0.3	0.25	
	Intervalo interquartilico	0.0 – 5.7	0.07 – 0.82	
<i>Akkermansia</i>	Min-Max	0.0 – 29.6	0.0 – 12.2	0.17
	Mediana	0.5	0.1	
	Intervalo interquartilico	0.0 – 2.4	0.0 – 1.22	

^a Teste Mann Whitney, * Significant when $p < 0.05$

Observando a composição dos gêneros individualmente nas amostras fecais de cada participante, nota-se que o gênero *Bacteroides* é o mais prevalente na maioria das participantes, entretanto observa-se uma relação inversa na abundância relativa dos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, onde as amostras com maior abundância de *Prevotella* apresentaram diminuição do gênero *Bacteroides*. Observando o grupo gestante nota-se que gêneros como *Akkermansia* e *Alistipes* apresentaram aumento em sua abundância relativa quando comparados com os achados no grupo não gestante. (Figura 10)

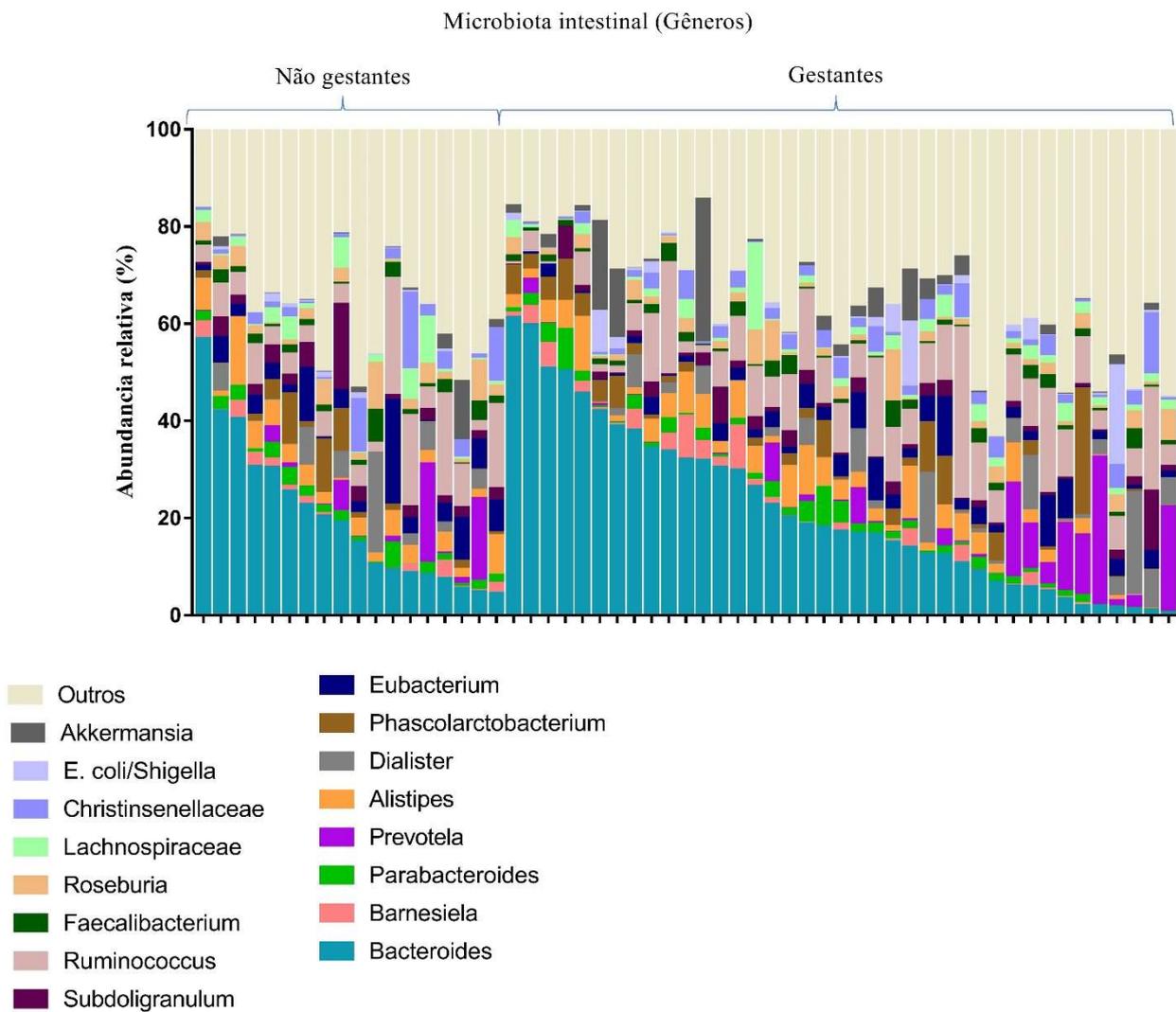


Figura 10: Principais gêneros bacterianos encontrados na microbiota intestinal em cada participante.

- Amostras orais

Os dois grupos apresentaram diferenças significativas considerando-se a abundância relativa da microbiota oral. O Filo Firmicutes teve maior abundância no grupo gestante quando comparado à não gestantes (60,0% x 37,4%, $p < 0,01$), enquanto o Filo Proteobacteria foi menor em gestantes (36,6% x 17,15%, $p < 0,01$) quando comparado ao grupo não gestante (Tabela 8). Além disso, os Filos Bacteroidetes e Fusobacteria foram menores no grupo gestante e Actinobacteria teve maior abundância no mesmo grupo (Figura 11 e Tabela 8).

Tabela 8. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos principais Filos bacterianos encontrados em amostras orais.

Microbiota oral (Filos)		Gestantes	Não gestantes	P ^a
<i>Firmicutes</i>	Min-Max	29 - 80.2	16.9 - 66.2	< 0.01*
	Mediana	60	37.4	
	Intervalo interquartilico	49.93 - 80.2	28.7- 47.7	
<i>Bacteroidetes</i>	Min-Max	0.7 - 25.2	1.6 - 13.2	0.82
	Mediana	5.35	7.5	
	Intervalo interquartilico	2.72 - 16	2.8 10.4	
<i>Proteobacteria</i>	Min-Max	3.0 - 60.1	20.7 - 70.5	< 0.01*
	Mediana	17.15	36.6	
	Intervalo interquartilico	10.75 - 24.0	27.3 - 54.6	
<i>Actinobacteria</i>	Min-Max	0.9 - 23.1	3.1 - 29.1	0.99
	Mediana	5.35	5.0	
	Intervalo interquartilico	3.15 - 8.95	3.9 - 7.4	
<i>Fusobacteria</i>	Min-Max	0.5 - 13.8	0.9 - 12.4	0.07
	Mediana	3.7	6.2	
	Intervalo interquartilico	1.95 - 6.8	4.2 - 9.6	

^a Teste Mann-Whitney; *Significante quando $p < 0,05$

Quando analisados os resultados das amostras orais individualmente, observamos que a microbiota oral tende a ter um perfil caracterizado pelo predomínio de Firmicutes nos dois grupos, entretanto, a microbiota oral tem um perfil único para cada indivíduo, onde é possível observar que nas participantes com aumento da abundância de Firmicutes há uma menor abundância de Proteobacteria. (Figura 11)

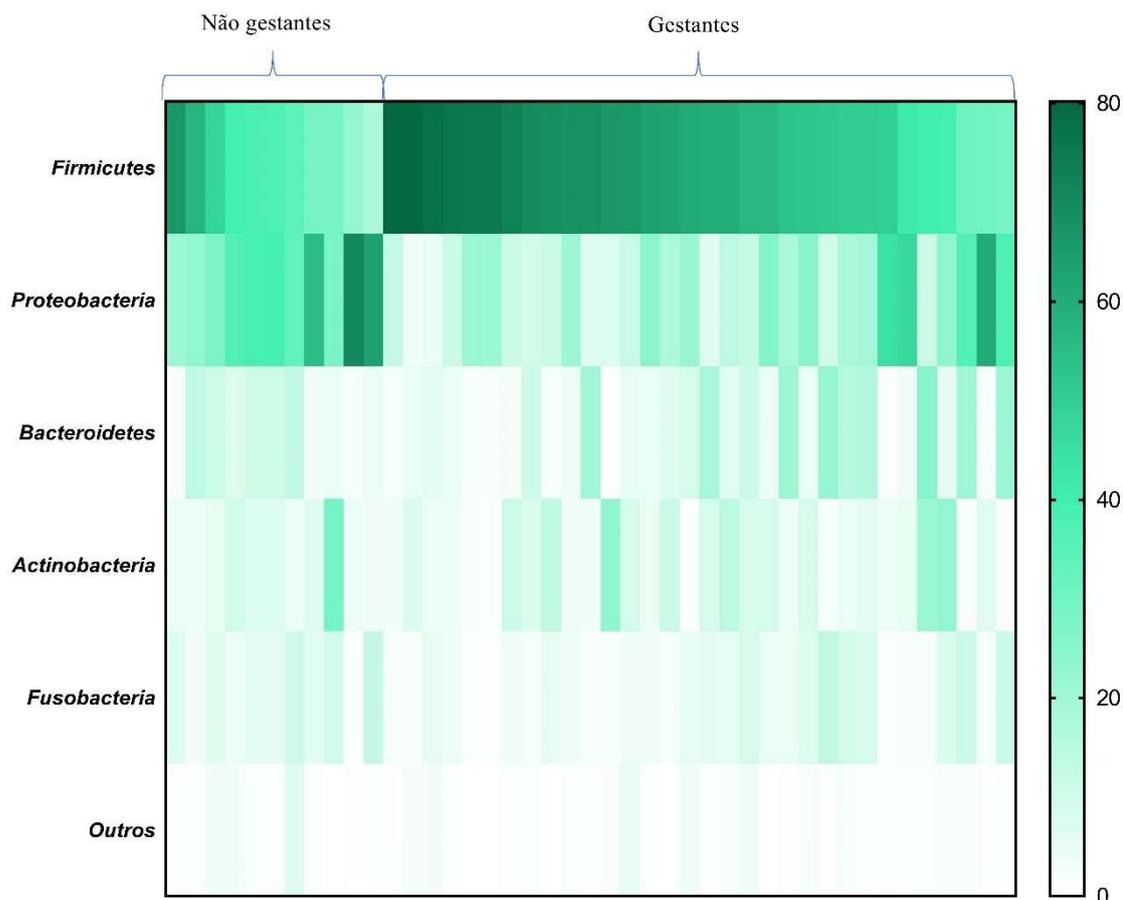


Figura 11: HeatMap do principais Filos bacterianos encontrados na microbiota oral em cada participante.

Em relação aos gêneros, observou-se predomínio significativo dos gêneros *Streptococcus* (26,0% x 12,9%, $p < 0,01$) e *Gemella* (4,2% x 2,0% , $p = 0,03$), bem como aumento da abundância de *Granulicatella* (1,1% x 0,6%, $p = 0,05$) e *Prevotella* (2,5% x 1,8%, $p = 0,57$) no grupo gestante em comparação ao grupo não gestante (Figura 12 e Tabela 9). Os gêneros *Haemophilus* (6,7% x 16,6%, $p < 0,01$), *Neisseria* (2,25% x 3,9%, $p < 0,01$) e *Veillonella* (9,9% x 10,4%, $p = 0,80$) foram menores nas gestantes comparadas às não gestantes (Figura 12 e Tabela 9).

Tabela 9. Medidas de tendência central e dispersão nos grupos em relação aos principais gêneros bacterianos encontrados em amostras orais.

Microbiota oral (gêneros)		Gestantes	Não gestantes	P ^a
<i>Streptococcus</i>	Min-Max	6.4 – 62.1	6.0 – 33.6	< 0.01*
	Mediana	26	12.9	
	Intervalo interquartilico	16.15 – 41.6	11 – 16.0	
<i>Granulicatella</i>	Min-Max	0 – 7.3	0 – 1.9	0.054
	Mediana	1.1	0.6	
	Intervalo interquartilico	0.42 – 2.47	0.2 – 0.9	
<i>Lactobacillus</i>	Min-Max	1.9 – 99.1	1.1 – 98.8	0.30
	Mediana	92.5	85.32	
	Intervalo interquartilico	73.1 – 96.7	15.2 – 98.8	
<i>Gardnerella</i>	Min-Max	0 – 64.5	0 – 69	0.06
	Mediana	0	0.6	
	Intervalo interquartilico	0 – 0.97	0 – 7.7	
<i>Veillonella</i>	Min-Max	0.9 – 51.2	3.8 – 31.3	0.8
	Mediana	9.9	10.4	
	Intervalo interquartilico	5.25 – 0	8.0 – 26.2	
<i>Gemella</i>	Min-Max	0.1 – 18.7	0 – 14.7	0.03*
	Mediana	4.2	2	
	Intervalo interquartilico	1.57 – 10.85	0.6 – 2.7	
<i>Rothia</i>	Min-Max	0.3 – 10.4	1.1 – 8.6	0.42
	Mediana	2.6	2.7	
	Intervalo interquartilico	0.82 – 5.05	1.8 – 6.5	
<i>Actinomyces</i>	Min-Max	0.1 – 16.6	0.2 – 13.1	0.69
	Mediana	1.65	1.9	
	Intervalo interquartilico	0.6 – 3.7	1.1 – 2.3	
<i>Fusobacterium</i>	Min-Max	0.2 – 9.5	0.4 – 11.0	0.054
	Mediana	1.4	3.1	
	Intervalo interquartilico	0.7 – 2.9	1.4 – 4.3	
<i>Leptotrichia</i>	Min-Max	0.2 – 7.5	0.5 – 6.4	0.46
	Mediana	1.55	2.3	
	Intervalo interquartilico	1.2 – 3.72	1.4 – 4.1	
<i>Prevotella</i>	Min-Max	0.2 – 21.9	0.9 – 11.2	0.57
	Mediana	2.5	1.8	
	Intervalo interquartilico	1.15 – 7.1	1.0 – 4.3	
<i>Lautropia</i>	Min-Max	0.0 – 6.7	0.0 – 4.3	0.30
	Mediana	0.55	1.9	
	Intervalo interquartilico	0.3 – 1.62	0.2 – 2.8	
<i>Aggregatibacter</i>	Min-Max	0.0 – 7.4	0.2 – 3.1	0.82
	Mediana	0.5	0.6	
	Intervalo interquartilico	0.22 – 1.67	0.2 – 0.9	
<i>Haemophilus</i>	Min-Max	0.7 – 33.5	4.7 – 62.0	< 0.01*
	Mediana	6.7	16.6	
	Intervalo interquartilico	2.7 – 12.7	5.7 – 41.1	
<i>Neisseria</i>	Min-Max	0.3 – 46.9	0.2 – 26.7	0.21
	Mediana	2.25	3.9	
	Intervalo interquartilico	1.1 – 5.7	1.7 – 14.2	

^a Teste Mann-Whitney; *Significante quando p < 0,05

Quando analisados individualmente os resultados da microbiota oral, observa-se que o gênero *Streptococcus* apresentou abundância maior nas participantes com menor abundância dos gêneros *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Haemophilus*. Observando as amostras do grupo gestantes é possível identificar um aumento do gênero *Gemella* quando comparadas com as amostras do grupo não gestante. observou-se ainda a diminuição do gênero *Gemella* nas amostras de gestantes que apresentavam maior abundância do gênero *Veillonella*. (Figura 12)

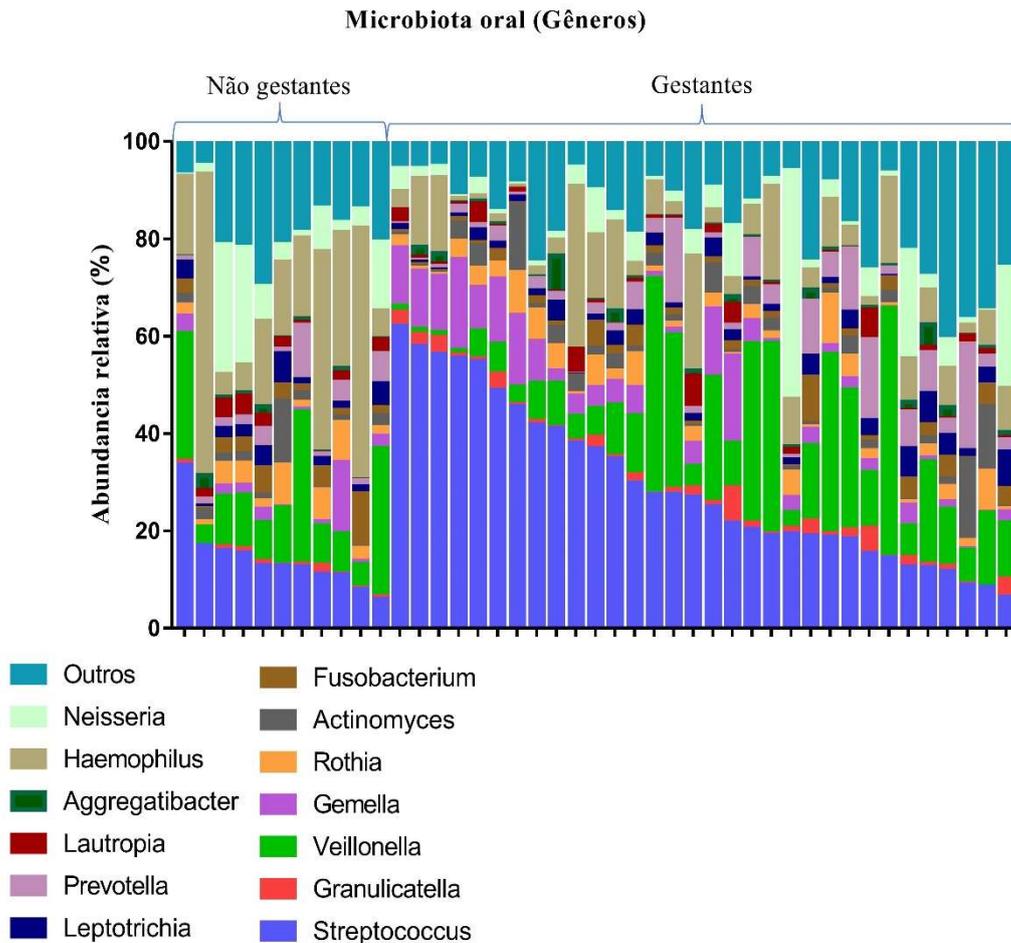


Figura 12: Principais gêneros bacterianos encontrados na microbiota oral em cada participante.

5.4.2 Alfa e Beta Diversidade.

A análise da alfa diversidade das amostras vaginais mostrou um aumento estatisticamente significativo do índice de riqueza de Chao 1 no grupo de gestantes (1308 x 2108, $p = 0,04$) em comparação com o não gestante (Figura 13a). Além disso, os índices de diversidade de Shannon e Simpson foram maiores no grupo de gestantes (Shannon 2,67 x 2,89, $p = 0,15$ e Simpson 0,74 x 0,77, $p = 0,44$) (Figuras 13b e 13c). Analisando a alfa diversidade nas amostras intestinais, observamos um aumento no valor de Chao 1 (3200 x 3230, $p = 0,89$) (Figura 13d) e uma diminuição de Shannon (5,10 x 4,94, $p = 0,06$) (Figura 13e) e Simpson (0,97 x 0,96, $p = 0,07$) (Figura 13f) no grupo gestante em comparação com o grupo não gestante. No entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas. A análise das amostras orais mostrou que o índice de riqueza de Chao 1 (2449 x 2130, $p = 0,34$) (Figura 13g) e índice de diversidade de Shannon (4,41 x 4,42, $p = 0,98$) (Figura 13h) foram maiores nas não gestantes, enquanto o índice de diversidade Simpson foi maior no grupo gestante (0,93 x 0,94, $p = 0,59$) (Figura 13i).

Alfa diversidade

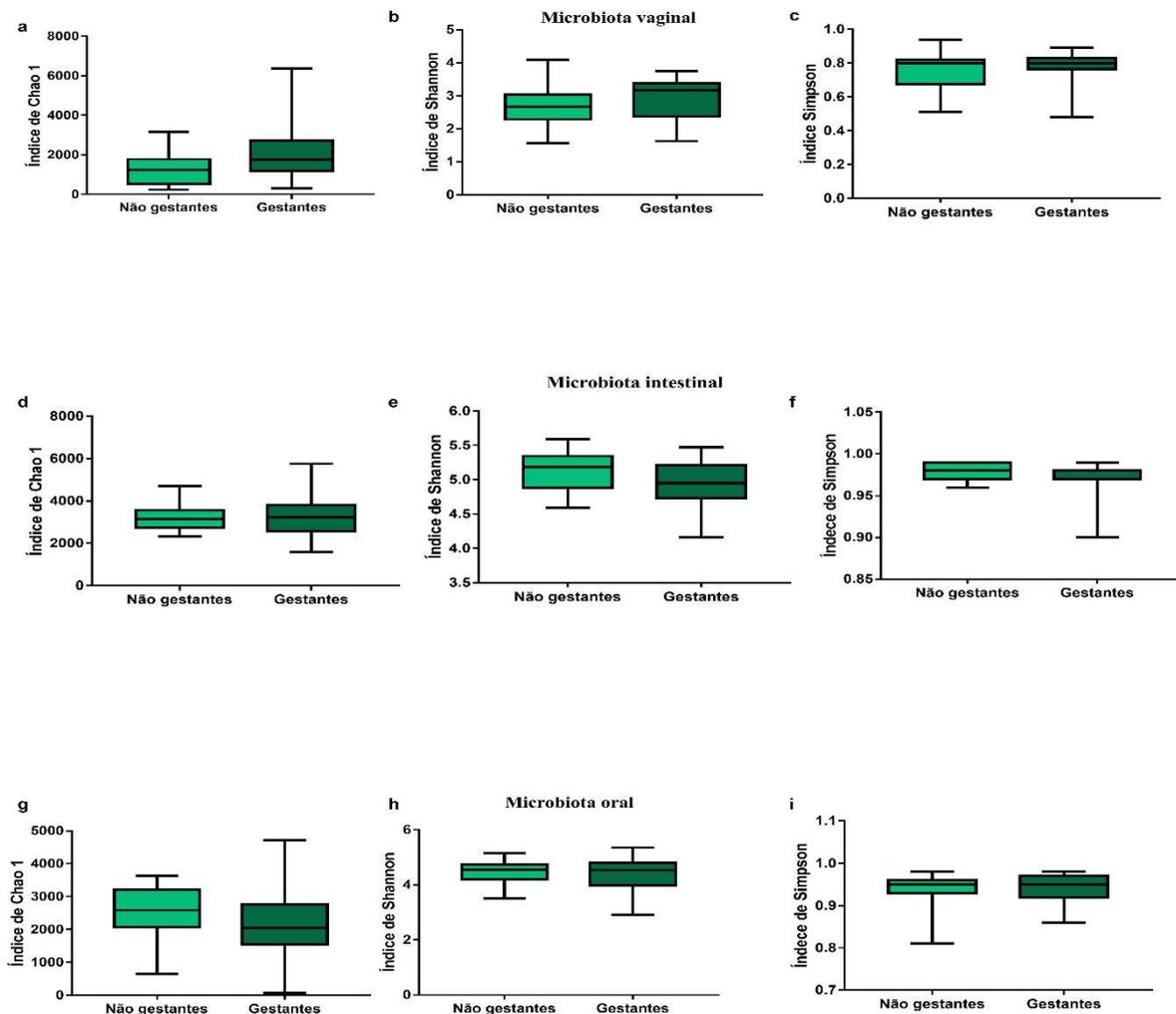


Figura 13: Alfa diversidade. A, D e G - índice de Chao 1, B, E e H - índice de Shannon e C, F e I - índice de Simpson das amostras vaginais, intestinais e orais, respectivamente.

Para a análise da beta diversidade, foi construída a análise de coordenadas principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac. As análises dos 3 sítios nas mesmas coordenadas mostraram que cada local se agrupou separadamente (Figura 14a). Os resultados da análise ponderada da beta diversidade encontram-se a esquerda na Figura 14, e as análises não ponderadas a direita. Existe uma pequena proximidade entre as comunidades bacterianas no PCoA ponderada, e não há diferenças no padrão de agrupamento de grupos grávidas e não grávidas para cada sítio. Analisamos também o gráfico de PCoA ponderado e não ponderado de cada sítio individualmente (14b - Vaginal, 14c - Intestinal e 14d - Oral), onde cada ponto representa um participante do estudo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nas análises de amostras vaginais e intestinais. A comunidade da microbiota vaginal não apresentou agrupamentos de acordo com os grupos. O grupo gestantes apresentou uma menor diversidade, e a representação da comunidade deste grupo está contida dentro da comunidade não gestante, em ambas as análises ponderadas e não-ponderadas (Figura 14b). A comunidade microbiana do intestino mostrou uma maior diversidade no grupo gestantes, com um agrupamento menor das amostras de não gestantes em ambos, ponderadas e não-ponderadas (Figura 14c). A comunidade microbiana oral apresentou tendência de agrupamento no PCoA ponderado, com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,005$) (Figura 14d).

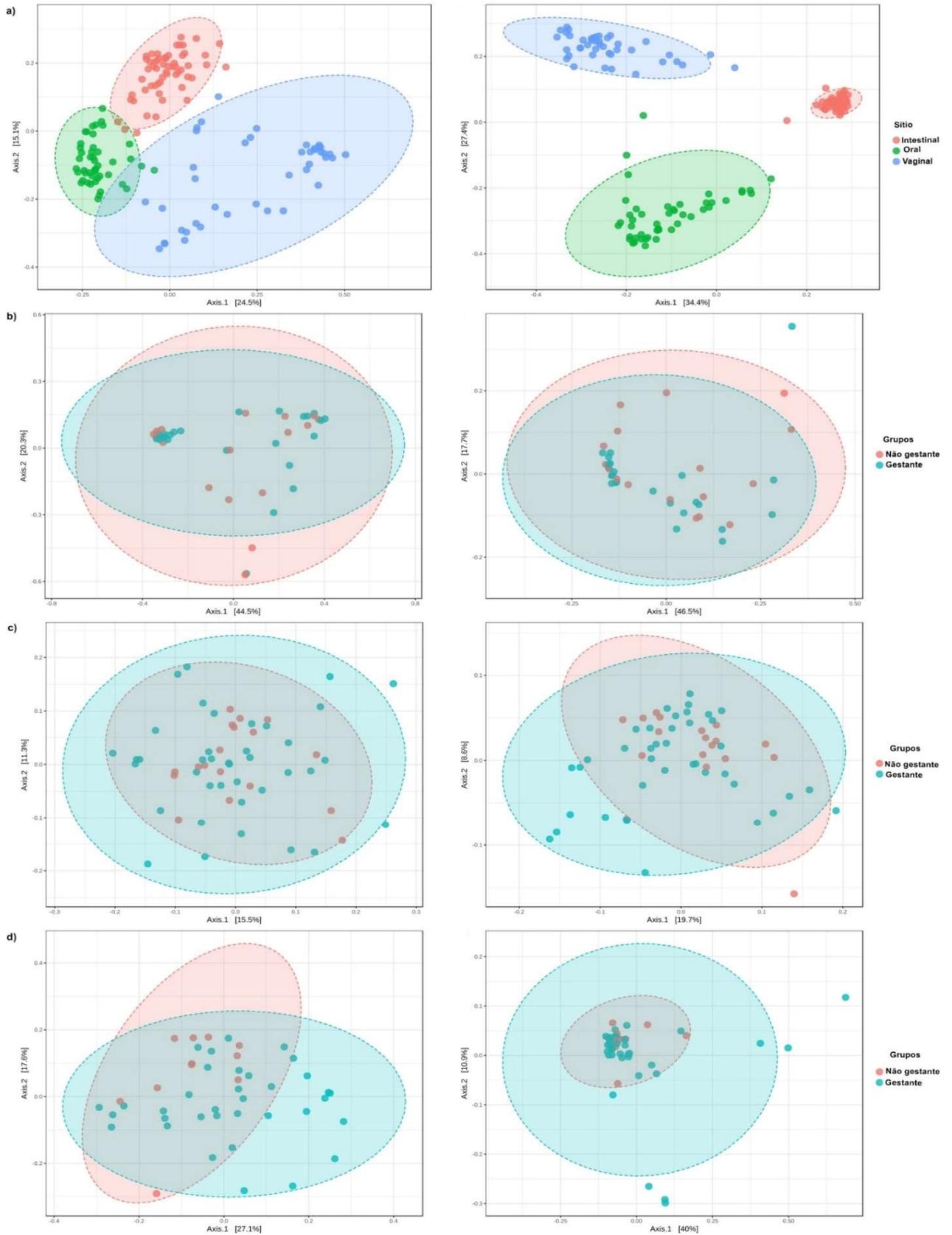


Figura 14: Coordenadas principais (PCoA) onde medidas ponderadas estão à esquerda e não ponderadas a direita. a- sítios; b- amostras vaginais; c- amostras intestinais e d- amostras orais.

6. Discussão

Sabe-se que a simbiose desenvolvida entre seres vivos e microrganismos comensais desempenha um importante papel na relação saúde-doença do hospedeiro. (MOLONEY, RACHEL D.DESBONNET et al., 2013) As interações ocorridas entre a microbiota e o hospedeiro são responsáveis pelo desfecho na saúde durante a infância e vida adulta. (CHO; BLASER, 2012) Tendo em vista a importância desempenhada pela relação entre microbiota e seu hospedeiro e a característica modulatória desta comunidade (KINROSS; DARZI; NICHOLSON, 2011), o presente estudo avalia a composição e principais características da microbiota de mulheres durante o período gestacional, comparando-os aos dados de mulheres não gestantes no período reprodutivo.

Não são muitos os trabalhos que dedicaram-se a observar a influência dos anticoncepcionais na microbiota em geral, entretanto, alguns trabalhos descreveram que mulheres que faziam uso regular de anticoncepcionais orais tiveram diminuição na incidência de vaginose bacterianas associadas a *Candida albicans*, uma vez que há manutenção de estrogênio na microbiota vaginal, estimulando a colonização por *Lactobacillus*. ((BROOKS et al., 2017; VAN DE WIJGERT et al., 2013) VAN DE WIJGERT et al., 2013) Observamos que 62% das mulheres não gestantes faziam uso de anticoncepcional oral no momento da coleta, e os achados em relação à microbiota vaginal mostram um domínio do gênero *Lactobacillus* associado a diminuição da presença de gêneros causadores de infecções vaginais como *Gardnerella*, *Atopobium* e *Shuttleworthia* em usuárias de anticoncepcionais, corroborando os dados publicados na literatura que se baseiam na hipótese de que o uso de contraceptivos orais estaria associado a diminuição da incidência de vaginose bacterianas.

Na quantificação bacteriana realizada nas amostras de secreção vaginal, não observamos variações na concentração de bactérias totais entre não gestantes e gestantes, o que aponta uma manutenção no valor absoluto da quantidade de bactérias da microbiota. As amostras aqui analisadas apresentaram um valor médio de 8,7 UFC/ml (log10), valor esse dentro do intervalo de 4,8-10,6 UFC/ml (log10), descrito por Freitas e colaboradores em 2017 (FREITAS et al., 2017).

Nosso trabalho aponta uma baixa prevalência de *Streptococcus agalactiae* nas mulheres que participaram deste estudo, confirmado por diferentes metodologias, como sequenciamento do gene *16S rRNA*, qPCR e PCR convencional. Hansen e colaboradores apresentaram uma coorte que acompanhou 77 gestantes durante toda a gravidez e seus recém-nascidos um ano

após o parto, e descrevem uma variação na colonização vaginal e perianal por *S. agalactiae*. Os autores apontam que 19% das mulheres apresentaram um perfil como portadoras intermitentes do *Streptococcus agalactiae* (HANSEN et al., 2004). Entretanto, o perfil epidemiológico da colonização vaginal por *Streptococcus agalactiae* é influenciado por aspectos regionais e biológicos, tendo diferentes valores de prevalência a depender das características regionais (Russell et al., 2017).

Na América do Sul a prevalência de *Streptococcus agalactiae* em gestantes é de 15,2% (Russell et al., 2017), e no Brasil, em 2010, a prevalência descrita foi de 9,5% (CASTELLANO-FILHO et al., 2010). Nosso trabalho encontrou uma prevalência de 12% de *Streptococcus agalactiae* na microbiota vaginal, quando consideramos os resultados obtidos pela cultura de secreção vaginal. Esse valor está próximo aos descritos pelos autores citados acima (Castellano-Filho et al., 2010; Russell et al., 2017).

A comparação entre técnicas de biologia molecular e cultura de secreção vaginal para a detecção de *Streptococcus agalactiae* vem sendo muito discutida recentemente. Trabalhos como o de Bidgani e colaboradores (2016) comparou a detecção de *S. agalactiae* em secreções vaginais e perianais usando técnicas de PCR e cultura de secreção, e encontraram uma maior detecção nos ensaios de PCR do que em culturas, 43,8% e 27,7% respectivamente. Diferentemente do que foi encontrado por Bidgani e colaboradores, nosso trabalho encontrou maior prevalência de *S. agalactiae* nas técnicas de cultura do que nas técnicas de PCR, tendo sido encontrado os valores de 12% e 0,04% respectivamente (BIDGANI et al., 2016). A constante discussão sobre qual deve ser o manejo profilático para os desfechos que a colonização por *S. agalactiae* no momento do parto pode causar geram incertezas e dúvidas sobre qual o melhor protocolo seguir nos profissionais, gerando assim a adoção de medidas empíricas, não fundamentadas em evidências, que são decididas pelo conhecimento individual dos profissional. Nosso trabalho não teve acesso integral às informações clínicas de cada paciente, questão essa que poderia esclarecer o motivo de encontrarmos uma baixa prevalência de *S. agalactiae* nas amostras vaginais.

Nos resultados obtidos para a caracterização da microbiota vaginal, foi observada predominância do Filo Firmicutes em ambos os grupos, tendo o grupo de gestantes um aumento não significativo deste Filo, porém uma diminuição significativa na abundância relativa dos Filos Actinobacteria e Bacteroidetes do mesmo grupo. Este fenômeno é observado em vários estudos que se dedicaram a comparar a microbiota vaginal durante o período gestacional e não

gestacional (MACINTYRE et al., 2015; MILLER et al., 2016; OAKLEY et al., 2008). Tais estudos encontraram aumento do Filo Firmicutes equivalente a diminuição dos gêneros Actinobacteria, Bacteroidetes e Clostridia. Em nosso estudo não encontramos valores significativos do Filo Clostridia, entretanto nossos demais achados corroboram com os trabalhos mencionados, onde observamos um aumento do Filo Firmicutes no grupo de mulheres gestantes. (MACINTYRE et al., 2015).

Nos dados apresentados, não houve significância estatística quanto às abundâncias dos gêneros encontrados; entretanto, observamos predominância do gênero *Lactobacillus* na microbiota vaginal em ambos os grupos. Trabalhos como o de MacIntyre e colaboradores também observaram na microbiota vaginal de mulheres europeias não gestantes e gestantes, através do uso da técnica de sequenciamento genético de nova geração, domínio do gênero *Lactobacillus* neste grupo (MACINTYRE et al., 2015). O aumento de *Lactobacillus* na microbiota vaginal de gestantes proporciona diminuição drástica do pH vaginal através da produção de lactato a partir do glicogênio vaginal livre. Desta forma, a presença de *Lactobacillus* em maior concentração na microbiota vaginal proporciona um ambiente hostil para outras bactérias que têm como pH ótimo um ambiente neutro a alcalino. Este evento justificaria a diminuição de gêneros bacterianos como *Prevotella*, *Atopobium* *Shuttleworthia* e *Gardnerella*, gêneros relacionados com maior incidência de vaginoses bacterianas e outras infecções genitais, como o HPV. (MILLER et al., 2016; OAKLEY et al., 2008).

Assim como o observado na literatura consultada, encontramos na microbiota vaginal das mulheres estudadas um perfil único deste sítio, onde em situações de eubiose, o gênero *Lactobacillus* é predominante na microbiota vaginal em detrimento da colonização de outros gêneros bacterianos, (ROMERO et al., 2014). Esta característica de redução de diversidade e o aumento da riqueza de determinados gêneros foi também evidenciada por nosso trabalho. Este perfil é constantemente associado a um trato vaginal mais saudável e com menor incidência de vaginoses (MARTIN, 2012; ROMERO et al., 2014), sendo de grande importância para os desfechos da vida feminina, como por exemplo a gestação, na qual a microbiota vaginal influencia o desfecho de forma direta.

Nossos achados em gestantes vão de encontro ao descrito por Hillier e colaboradores (1995), que através de análises de secreções vaginais de gestantes, usando técnicas de coloração de gram e avaliação do pH vaginal, somados aos achados clínicos das pacientes, observaram que gestantes tendem a ter uma microbiota composta majoritariamente por *Lactobacillus*

enquanto outras bactérias anaeróbicas como *Atopobium*, *Prevotella* e *Gardnerella*, potenciais causadores de vaginoses bacterianas, diminuem neste período (HILLIER et al., 1995; WEN et al., 2014). Dessa forma, a disbiose da microbiota vaginal após o segundo trimestre está associada com aumento dos casos de vaginoses bacteriana em gestantes, implicando desta forma em um maior número de partos prematuros e de recém-nascidos com baixo peso ao nascer (HILLIER et al., 1995; WEN et al., 2014). Sendo assim a competição por sítios de colonização com potenciais patógenos e a produção de substâncias capazes de controlar o povoamento de outros microrganismos, como o lactato e bacteriocinas pelos *Lactobacillus*, previnem o surgimento de vaginoses bacterianas durante a gestação (HILLIER et al., 1995).

Observando as espécies encontradas em nosso trabalho vemos que *Lactobacillus iners* é a espécie com maior prevalência na microbiota vaginal nas amostras vaginais estudadas. Ravel e colaboradores descreveram a presença de 5 perfis de microbiota vaginal, onde o perfil predominado por *Lactobacillus crispatus* foi o observado no estudo com maior prevalência (40%), entretanto o perfil predominado por *Lactobacillus iners* foi o segundo mais comum entre as participantes com 34% de prevalência (RAVEL; BROTMAN, 2016). O papel do *Lactobacillus iners* para o sítio vaginal vem sendo constantemente discutido. O predomínio desta espécie na microbiota vaginal foi associado a presença de espécies patogênicas como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia* e *Atopobium vaginae* e associado a maior incidência de trabalho de parto prematuro. (DONDERS, 2007) Além disto, outro motivo que leva ao questionamento do papel do *Lactobacillus iners* na homeostase da microbiota vaginal está associada à isoforma do ácido láctico. *L. inners* não é capaz de produzir ácido láctico D sendo capaz de sintetizar apenas ácido láctico L, e esta isoforma do lactato oferece menos proteção contra desequilíbrios da microbiota quando comparado com ácido láctico D (AMABEBE; ANUMBA, 2018).

Entretanto, alguns trabalhos comparando o metatranscriptoma vaginal entre mulheres com e sem disbiose demonstram a capacidade de *Lactobacillus iners* de se adaptar a uma microbiota vaginal transitória, onde encontraram expressão diferencial de 10% dos genes de *Lactobacillus iners* em comunidades com perfil disbiótico (KINDINGER et al., 2017; VÁSQUEZ et al., 2002). A hipótese é que *L. Iners* seja capaz de se adaptar a disbiose, modificando sua expressão gênica do metabolismo, citólise e genes de defesa sendo mais resistente as mudanças ambientais ocorridas em situações disbióticas do que outras espécies (BORGDORFF et al., 2016).

Acreditamos que a presença de *Lactobacillus iners* também pode estar relacionada a manutenção de perfis eubióticos da microbiota vaginal já que em nosso trabalho encontramos maior prevalência da espécie de *Lactobacillus iners* em detrimento de espécies patogênicas como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia* e *Atopobium vaginae*.

A microbiota intestinal das mulheres participantes deste estudo apresentou predomínio dos Filos Firmicutes e Bacteroidetes, seguido de Actinobacteria e Proteobacteria. Estes Filos são os encontrados em trabalhos que observaram a composição da microbiota intestinal de mulheres gestantes e não gestantes (NURIEL-OHAYON; NEUMAN; KOREN, 2016). Ainda na observação dos principais Filos encontrados, nosso trabalho encontrou aumento do Filo Verrucomicrobia nas participantes do grupo gestantes. Observamos que a abundância de Firmicutes está reduzida no grupo gestantes e o Filo Bacteroidetes tem a mesma abundância em ambos, o que implica na diminuição da razão *Firmicutes/Bacteroidetes*. Diversos trabalhos descreveram a associação da diminuição da razão *Firmicutes/Bacteroidetes* com benefícios para a perda de massa corporal (KOLIADA et al., 2017). Com isso, acreditamos que a diminuição da relação entre estes dois Filos pode estar relacionada às adaptações pelas quais o organismo materno passa para garantir um estado fisiologicamente equilibrado, uma vez que, durante a gestação, é comum o aumento da massa corporal.

Os principais gêneros encontrados em ambos os grupos foram *Ruminococcus* e *Bacteroides*. Também pudemos observar pequenas mudanças no perfil da microbiota intestinal de gestantes quando comparados a de não gestantes, tais como o aumento da abundância relativa dos gêneros *Ruminococcus*, *Bacteroides* e *Akkermansia*, conhecidos como gêneros produtores de ácidos graxos de cadeia curta. Alguns estudos apontam a participação dos ácidos graxos de cadeia curta em diversos processos biológicos, sendo observados seus benefícios anti-inflamatórios e a participação na prevenção e controle de doenças inflamatórias sistêmicas como as hipertensões e Diabetes Mellitus (GOMEZ ARANGO et al., 2015; MORRISON; PRESTON, 2016). Além disto, o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta promove a modulação do sistema imune uma vez que sua presença está envolvida com o recrutamento de linfócitos T regulatórios (BLASER; DOMINGUEZ-BELLO, 2016).

Além de seu papel na produção de ácidos graxos de cadeia curta, os gêneros *Ruminococcus* e *Bacteroides* foram apontados por Kwa M. e colaboradores (2016), como gêneros capazes de produzir as enzimas beta glucuronidase e beta glucosidase, enzimas envolvidas no metabolismo do estrogênio, auxiliando a manutenção dos níveis de estrogênio

disponíveis (BAKER; AL-NAKKASH; HERBST-KRALOVETZ, 2017; KWA et al., 2016). Esta relação entre os genes expressos pela microbiota e a produção de estrogênio pelo hospedeiro foi descrita como Estroboloma (PLOTTEL; BLASER, 2011). Ainda não está completamente elucidado qual a composição do Estroboloma e os papéis desempenhados nos processos de saúde e doença para o hospedeiro, entretanto alguns estudos como o realizado por Fuhrman e colaboradores (2014) demonstrou uma relação estatisticamente significativa entre o aumento da diversidade filogenética da microbiota intestinal e a relação entre metabolitos do estrogênio e o estrogênio presentes na urina de mulheres (FUHRMAN et al., 2014) Outros trabalhos como o de Flores e colaboradores (2012) observou a relação entre a riqueza da microbiota intestinal, os níveis de estrogênio presente nas fezes e circulante e a atividade da enzima beta glucuronidase (FLORES et al., 2012). Estes achados apoiam a hipótese de que as variações dos níveis de estrogênio e o seu metabolismo estariam correlacionados a composição e a diversidade da microbiota intestinal.

O aumento do gênero *Akkermansia*, pertencente ao Filo Verrucomicrobia, apresentou maior abundância e prevalência nas pacientes do grupo gestantes, reforçando a ideia de manutenção do estado eubiótico da microbiota intestinal neste grupo. Nos últimos anos muito vem se destacado sobre o papel da *Akkermansia* na homeostasia metabólica de pacientes obesos que foram submetidos à cirurgia bariátrica ou com diabetes após mudanças na dieta. (CORTEZ et al., 2018b; DAO et al., 2016) A presença da proteína AMUC 1100, proteína expressa na membrana externa de membros do gênero *Akkermansia*, foi recentemente associada a este estado de eubiose atuando, também, de maneira sistêmica no hospedeiro (PLOVIER et al., 2017). Ensaios experimentais, como o realizado por Plovier e colaboradores, demonstrou em um modelo animal que AMUC 1100 tem efeitos benéficos, diminuindo o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e atuando de forma a controlar os processos inflamatórios normalmente associados à essas condições.

Através da análise das diversidades alfa e beta, foi possível observar o aumento da diversidade no intestino, assim como a presença dos gêneros citados a cima, este aumento da diversidade está associado a eubiose da comunidade (NURIEL-OHAYON; NEUMAN; KOREN, 2016). Tendo em mente o enriquecimento de tais gêneros e o aumento da diversidade no grupo gestante, vemos o favorecimento de um perfil capaz de garantir a homeostasia durante a gravidez, além de auxiliarem no equilíbrio da produção de hormônios fundamentais para a gestação, prevenindo assim o desenvolvimento de complicações obstétricas, além de assegurar a manutenção de um ambiente favorável para o desenvolvimento da gestação saudável.

A microbiota oral no grupo gestantes apresentou aumento significativo da abundância de *Streptococcus* e *Gemella* associados a diminuição de *Fusobacterium* e *Prevotella*. Diversos estudos apontaram que a presença de várias espécies do gênero *Streptococcus* têm um papel importante na microbiota oral, sendo precursores e auxiliando no desenvolvimento do biofilme dental (KOLENBRANDER et al., 2010). Por outro lado, *Fusobacterium* é um gênero bacteriano relacionado com um perfil mais disbiótico, associado à doenças periodontais, devido à sua capacidade patogênica de fixação e invasão das células epiteliais (COBB et al., 2017). Trabalhos recentes sugerem que a microbiota oral está intimamente relacionada com a composição e colonização benigna da microbiota placentária (AAGAARD K, MA J, ANTONY K M, GANU R, PETROSINO J, 2014). Entretanto, a colonização da placenta por uma comunidade microbiana residente ainda é uma questão controversa e muito discutida entre a comunidade científica. Ainda não foi completamente esclarecido como a microbiota oral e a placentária interagem, e a relação entre as comunidades bacterianas de ambos os locais. Um estudo recente dedicou-se a caracterizar a composição da microbiota supra gengival de mulheres grávidas e não grávidas, e os resultados sugeriram que a gestação influenciou na composição da microbiota supra gengival (LIN et al., 2018).

A manutenção da eubiose oral faz-se extremamente importante para o desenvolvimento fisiológico da gestação, uma vez que a disbiose da comunidade bacteriana oral acarretaria na maior incidência de doenças infecciosas orais como as periodontites e levaria à produção de mediadores pró inflamatórios, quadro este associado à patologias obstétricas como o abortamento de recorrência e trabalho de parto prematuro, além de estar relacionado com a maior susceptibilidade do desenvolvimento de pré eclampsia (COBB et al., 2017; MARQUES-ROCHA et al., 2015; MEURIC et al., 2017).

Utilizando um corte de 1% como filtro na análise da abundância relativa das comunidades microbianas de cada sítio, o único gênero bacteriano encontrado nos três sítios foi *Prevotella*. Sua prevalência foi maior nos sítios oral e intestinal e menor no sítio vaginal. Diversos estudos descrevem a importância de *Prevotella* na microbiota humana nos estados de eubiose e disbiose, um exemplo disso é seu papel na microbiota intestinal durante digestão de carboidratos vegetais em dieta rica em vegetais (DE FILIPPO et al., 2010; FLINT et al., 2012), inflamações crônicas (JIANG et al., 2015), obesidade, estados disbióticos da microbiota vaginal (SI et al., 2017) e condições de saúde oral precárias (GAO et al., 2018). Gupta e colaboradores realizaram avaliações genômicas de *Prevotella* em diferentes locais do corpo humano, e observaram a capacidade de adaptação de espécies específicas de *Prevotella* aos diferentes

microambientes do corpo humano, através da aquisição seletiva e eliminação de famílias gênicas, permitindo sua permanência e colonização nos diferentes sítios do corpo humano (GUPTA et al., 2015). Desta forma, acreditamos que essa adaptação pode ser guiada pelas condições imunes do hospedeiro e pelos diferentes membros específicos que dominam a microbiota, como *Lactobacillus* na microbiota vaginal, *Streptococcus* na microbiota oral e bactérias produtoras de butirato na microbiota intestinal. Os resultados obtidos pela análise de beta diversidade, UniFrac, de cada sítio corrobora nossa proposição, já que as bactérias dominantes de cada sítio determinam a composição da comunidade microbiana e encontramos a presença de OTUs que tendem a ser compartilhadas entre os sítios.

Não são muitos os estudos que descreveram a composição da microbiota de mulheres grávidas nos diversos sítios, tais como o oral, vaginal e intestinal. Wang et al. (2018) descreveram recentemente a composição da microbiota dos mesmos sítios em gestantes que desenvolveram diabetes mellitus gestacional, evidenciando a presença de um perfil disbiótico relacionado ao diabetes mellitus gestacional (DIGIULIO et al., 2015; WANG et al., 2018). caracterizaram a variação microbiana durante a gravidez de quatro sítios maternos: vagina, intestino (fezes), saliva e gengivas, descrevendo a estabilidade da microbiota durante o período gestacional em todos os sítios observados (DIGIULIO et al., 2015; GOLTSMAN et al., 2018). Goltsman et al (2018) avaliaram a composição da microbiota em diferentes sítios de gestantes cursando gestação pré termo e a termo, e evidenciou que as gestantes que apresentaram mudanças no perfil da microbiota intestinal e oral, mudanças similares a perfis disbióticos, tinham maior suscetibilidade a desenvolver complicações obstétricas (GOLTSMAN et al., 2018). O estudo não incluiu mulheres não gestantes para comparar os resultados.

7. Conclusão.

- A quantidade de bactérias totais encontradas nas amostras de secreção vaginal de gestantes não gestantes foi semelhante, evidenciando a semelhança na ocupação do nicho vaginal, independente da diversidade bacteriana encontrada.

- A quantidade de *Streptococcus agalactiae* encontrada no grupo gestante foi muito inferior à descrita na literatura, e com os dados clínicos disponíveis de cada pacientes, não foi possível relacionar esses achados com alguma condição clínica ou coleta que explicasse esse fato.

- A microbiota vaginal de gestantes apresenta uma maior abundância de *Lactobacillus* e diminuição de gêneros disbióticos como *Prevotella*, *Atopobium* e *Gardnerella*, evidenciando um perfil de modulação eubiótico, em relação aos achados em mulheres não gestantes.

- A microbiota vaginal das participantes é predominantemente colonizada por *Lactobacillus iners*.

- A microbiota intestinal de gestantes apresenta maior abundância dos gêneros *Bacteroides*, *Ruminococcus* e *Akkermansia* enquanto o gênero *Prevotella* apresentou redução de sua abundância, demonstrando que gêneros produtores de ácidos graxo de cadeia curta e correlacionados com perfis eubióticos são favorecidos pela gestação.

- A microbiota oral de gestantes é caracterizada pela dominância de *Streptococcus* associada a diminuição de gêneros como *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Haemophilus*, o predomínio de *Streptococcus* demonstra que a gestação influencia a manutenção de um perfil eubiótico garantindo proteção contra patologias orais.

- *Prevotella* foi o único gênero encontrado em todos os sítios estudados, sendo relacionado à modulação da microbiota tanto em situações de eubiose como disbiose.

- Nossos resultados contribuem para um melhor entendimento das relações bacterianas que ocorrem no organismo humano, em especial as modulações envolvendo a gestação, o corpo feminino sofre modulação da microbiota em diferentes sítios, a fim de manter um perfil eubiotico. A manutenção de um estado eubiotico durante a gravidez é fundamental para o adequado desenvolvimento da gravidez garantindo assim melhoria da saúde reprodutiva feminina.

“Declaro que o documento de defesa de dissertação apresentado foi escrito por mim e que as citações de outros autores estão devidamente indicadas e referenciadas no texto. Declaro, ainda, que esse documento foi submetido a análise de similaridade pela ferramenta CopySpider para garantir sua integridade quanto à ocorrência de plágio”.

8.Referências.

AAGAARD K, MA J, ANTONY K M, GANU R, PETROSINO J, V. J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. v. 6, n. 237, p. 1–22, 2014.

ALTERMANN, E. et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 11, p. 3906–3912, 2005.

AMABEBE, E.; ANUMBA, D. O. C. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. June, p. 1–11, 2018.

AVILA, M.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ, Ö. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. **DNA and Cell Biology**, v. 28, n. 8, p. 405–411, 2009.

BAKER, J. M.; AL-NAKKASH, L.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Estrogen-gut microbiome axis: Physiological and clinical implications. **Maturitas**, v. 103, p. 45–53, 2017.

BELDA-FERRE, P. et al. The oral metagenome in health and disease. **ISME Journal**, v. 6, n. 1, p. 46–56, 2012.

BIDGANI, S. et al. **Comparison of group B streptococci colonization in vaginal and rectal specimens by culture method and polymerase chain reaction technique** **Journal of the Chinese Medical Association**, 2016.

BLASER, M. J.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G. The Human Microbiome before Birth. **Cell Host and Microbe**, v. 20, n. 5, p. 558–560, 2016.

BLASER, M. J.; FALKOW, S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 887–894, 2009.

BORGDORFF, H. et al. Unique insights in the cervicovaginal *Lactobacillus iners* and *L.*

crispatus proteomes and their associations with microbiota dysbiosis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–14, 2016.

BOSKEY, E. R. et al. Origins of vaginal acidity: High D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1809–1813, 2001.

BROOKS, J. P. et al. Effects of combined oral contraceptives, depot medroxyprogesterone acetate and the levonorgestrel-releasing intrauterine system on the vaginal microbiome. **Contraception**, v. 95, n. 4, p. 405–413, 2017.

BROWN, A. J. et al. The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 13, p. 11312–11319, 2003.

CAICEDO, R. A. et al. The developing intestinal ecosystem: Implications for the neonate. **Pediatric Research**, v. 58, n. 4, p. 625–628, 2005.

CASTELLANO-FILHO, D. S. et al. Detection of group B *Streptococcus* in Brazilian pregnant women and antimicrobial susceptibility patterns. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1047–1055, 2010.

CHAO A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of statistics**, v. 11, n. 4, p. 265–270, 1984.

CHO, I.; BLASER, M. J. The human microbiome: At the interface of health and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 260–270, 2012.

CLEMENTE, J. C. et al. HHS Public Access. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258–1270, 2016.

COBB, C. et al. The oral microbiome and adverse pregnancy outcomes. **International Journal of Women's Health**, v. Volume 9, p. 551–559, 2017.

CORTEZ, R. V. et al. Microbiome and its relation to gestational diabetes. **Endocrine**, 2018a.

CORTEZ, R. V. et al. Shifts in intestinal microbiota after duodenal exclusion favor glycemic control and weight loss: a randomized controlled trial. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 000, p. 1–7, 2018b.

D, M. et al. The firmicutes/Bacteroidetes ratio of human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 23, 2009.

DAO, M. C. et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. **Gut**, v. 65, n. 3, p. 426–436, 2016.

DE BACKER, E. et al. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 115, 2007.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 2010.

DHARIWAL, A. et al. MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W180–W188, 2017.

DIGIULIO, D. B. et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 35, p. 11060–11065, 2015.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences, v. 107, n. 26, p. 11971–11975, 2010.

DONDERS, G. G. G. Definition and classification of abnormal vaginal flora. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 21, n. 3, p. 355–373, 2007.

DURFEE, T. et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2597–2606, 2008.

EDWARDS, S. M. et al. The Maternal Gut Microbiome during Pregnancy. **MCN The American Journal of Maternal/Child Nursing**, v. 42, n. 6, p. 310–316, 2017.

EGGESBØ, M. et al. Development of gut microbiota in infants not exposed to medical interventions. **Apmis**, v. 119, n. 1, p. 17–35, 2011.

FAITH, D. P.; BAKER, A. M. Phylogenetic Diversity (PD) and Biodiversity Conservation: Some Bioinformatics Challenges. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 2, p. 121–128, 2006.

FALLANI, M. et al. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1385–1392, 2011.

FLINT, H. J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 10, p. 577–589, 2012.

FLORES, R. et al. Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: A cross-sectional study. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2012.

FREITAS, A. C. et al. The vaginal microbiome of pregnant women is less rich and diverse, with lower prevalence of Mollicutes, compared to non-pregnant women. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

FUHRMAN, B. J. et al. Associations of the fecal microbiome with urinary estrogens and estrogen metabolites in postmenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 12, p. 4632–4640, 2014.

FUJIWARA, N. et al. Significant increase of oral bacteria in the early pregnancy period in Japanese women. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2017.

FULLER, M. et al. The short-chain fatty acid receptor, FFA2, contributes to gestational glucose homeostasis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 309, n. 10, p. E840–E851, 2015.

FURET, J. P. et al. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 3, p. 351–362, 2009.

GAO, L. et al. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. **Protein and Cell**, v. 9, n. 5, p. 488–500, 2018.

GAO, W. et al. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: A cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, 2013.

GODHA, K. et al. Human vaginal pH and microbiota: an update. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 6, p. 451–455, 2018.

GOHIR, W.; RATCLIFFE, E. M.; SLOBODA, D. M. Of the bugs that shape us: Maternal obesity, the gut microbiome, and long-term disease risk. **Pediatric Research**, v. 77, n. 1, p. 196–204, 2015.

GOLTSMAN, D. S. A. et al. Metagenomic analysis with strain-level resolution reveals fine-scale variation in the human pregnancy microbiome. **bioRxiv**, p. 266700, 2018.

GOMEZ-ARANGO, L. F. et al. Increased Systolic and Diastolic Blood Pressure is Associated with Altered Gut Microbiota Composition and Butyrate Production in Early Pregnancy.

Hypertension, v. 68, n. 4, p. 974–981, 2016.

GOMEZ ARANGO, L. F. et al. Probiotics and Pregnancy. **Current Diabetes Reports**, v. 15, n. 1, p. 0–9, 2015.

GUPTA, V. K. et al. Divergences in gene repertoire among the reference *Prevotella* genomes derived from distinct body sites of human. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2015.

GUPTA, V. K.; PAUL, S.; DUTTA, C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, 2017.

HANSEN, S. M. et al. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants Dynamics of *Streptococcus agalactiae* Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 83–89, 2004.

HICKEY, R. J. et al. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. **Translational Research**, v. 160, n. 4, p. 267–282, 2012.

HILLIER, S. L. et al. Association between Bacterial Vaginosis and Preterm Delivery of a Low-Birth-Weight Infant. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 26, p. 1737–1742, 1995.

HOMMA, H. et al. The female intestine is more resistant than the male intestine to gut injury and inflammation when subjected to conditions associated with shock states. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, n. 3, p. G466–G472, 2004.

JESPERS, V. et al. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

JIANG, W. et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–7, 2015.

JOVEL, J. et al. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–17, 2016.

KINDINGER, L. M. et al. The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2017.

KINROSS, J. M.; DARZI, A. W.; NICHOLSON, J. K. Gut microbiome-host interactions in health and disease. **Genome Medicine**, v. 3, n. 3, p. 14, 2011.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1–11, 2013.

KOLENBRANDER, P. E. et al. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 471–480, 2010.

KOLIADA, A. et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 4–9, 2017.

KONSTANTINOV, S. R.; VAN DER WOUDE, C. J.; PEPPELENBOSCH, M. P. Do pregnancy-related changes in the microbiome stimulate innate immunity? **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 8, p. 454–459, 2013.

KOREN, O. et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during

pregnancy. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 470–480, 2012.

KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; ARORA, T. Nutrition, the gut microbiome and the metabolic syndrome. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 1, p. 59–72, 2013.

KWA, M. et al. The intestinal microbiome and estrogen receptor-positive female breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 8, p. 1–10, 2016.

LANCE W. PETERSON AND DAVID ARTIS. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141–153, 2014.

LIM, Y. et al. Oral microbiome: A new biomarker reservoir for oral and oropharyngeal cancers. **Theranostics**, v. 7, n. 17, p. 4313–4321, 2017.

LIN, W. et al. Ecological Shifts of Supragingival Microbiota in Association with Pregnancy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. February, p. 1–11, 2018.

LOZUPONE, C. A. et al. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1576–1585, 2007.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

MACINTYRE, D. A. et al. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. **Scientific Reports**, v. 5, n. Cst Iv, p. 1–9, 2015.

MACKLAIM, J. M. et al. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. **Microbiome**, v. 1, n. 1,

p. 1–11, 2013.

MARQUES-ROCHA, J. L. et al. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. **FASEB Journal**, v. 29, n. 9, p. 3595–3611, 2015.

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

MEURIC, V. et al. Signature of microbial dysbiosis in periodontitis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 14, p. 1–13, 2017.

MILLER, E. A. et al. Lactobacilli dominance and vaginal pH: Why is the human vaginal microbiome unique? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. DEC, p. 1–13, 2016.

MIRMONSEF, P. et al. Free glycogen in vaginal fluids is associated with *Lactobacillus* colonization and low vaginal pH. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 26–29, 2014.

MOLONEY, RACHEL D. DESBONNET, L. et al. The microbiome: stress, health and disease. **Mammalian Genome**, v. 25, n. 1–2, p. 49–74, 2013.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189–200, 2016.

NATARAJAN, G. et al. Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection of Group B Streptococcal Colonization in Neonates. **Pediatrics**, v. 118, n. 1, p. 14–22, 2006.

NAVAS-MOLINA, J. A. et al. **Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 531

NURIEL-OHAYON, M.; NEUMAN, H.; KOREN, O. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–13, 2016.

OAKLEY, B. B. et al. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations

with clinically defined bacterial vaginosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4898–4909, 2008.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.

PELZER, E. et al. Review: Maternal health and the placental microbiome. **Placenta**, v. 54, p. 30–37, 2017.

PETROVA, M. I. et al. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 762–792, 2013.

PLOTTEL, C. S.; BLASER, M. J. Microbiome and Malignancy. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 0 1, p. 324–335, 2011.

PLOVIER, H. et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. **Nature Medicine**, v. 23, n. 1, p. 107–113, 2017.

PYLRO, V. S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30–37, 2014.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

RAVEL, J.; BROTMAN, R. M. Translating the vaginal microbiome: Gaps and challenges. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 2–4, 2016.

ROMERO, R. et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. **Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 1–19, 2014.

RUSSELL, N. J. et al. Maternal Colonization with Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. February, p. S100–S111, 2017.

SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. **Bell System Technical Journal**, v. 5, n. 3, p. 3, 1948.

SI, J. et al. Prevotella as a Hub for Vaginal Microbiota under the Influence of Host Genetics and Their Association with Obesity. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 1, p. 97–105, 2017.

SICARD, J.-F. et al. Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. September, 2017.

SOMA-PILLAY PRIYA, NELSON-PIERCY CATHERINE, TOLPPANEN HELI, M. A. Physiological Changes in Pregnancy. **Heart Disease in Pregnancy: Second Edition**, v. 27, n. 2, p. 6–17, 2016.

TADDEI, C. R. et al. Microbiome in normal and pathological pregnancies: A literature overview. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 80, n. 2, p. 1–9, 2018.

TAN, K. & TAN, L. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 27, n. 6, p. 791–802, 2013.

TANAKA, S. et al. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 80–87, 2009.

THOMPSON, I. O. C. et al. A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. **Archives of Oral Biology**, v. 46, n. 12, p. 1091–1098, 2001.

TURNBAUGH, P. J. et al. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804–810, 2007.

VAN DE WIJGERT, J. H. H. M. et al. Hormonal contraception decreases bacterial vaginosis but oral contraception may increase candidiasis. **Aids**, v. 27, n. 13, p. 2141–2153, 2013.

VAN DE WIJGERT, J. H. H. M. et al. The vaginal microbiota: What have we learned after a decade of molecular characterization? **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

VÁSQUEZ, A. et al. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2746–2749, 2002.

VOGELMANN, R.; AMIEVA, M. R. The role of bacterial pathogens in cancer. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 76–81, 2007.

WALDECKER, M. et al. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 9, p. 587–593, 2008.

WANG, B. et al. The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 71–82, 2017.

WANG, J. et al. Gestational diabetes and offspring's growth from birth to 6 years old. **International Journal of Obesity**, 2018.

WEN, A. et al. Selected vaginal bacteria and risk of preterm birth: An ecological perspective. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 7, p. 1087–1094, 2014.

WHITTAKER, R. H. Evolution and Measurement of Species Diversity Published by : International Association for Plant Taxonomy (IAPT) Linked references are available on JSTOR for this article : EVOLUTION AND MEASUREMENT OF SPECIES DIVERSITY ". **Internartional Association for Taxonomy**, v. 21, n. 2, p. 213–251, 1972.

YOUNES, J. A. et al. Women and Their Microbes: The Unexpected Friendship. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 16–32, 2018.

ZAURA, E. et al. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–12, 2009.

ZHANG, Y. et al. Human oral microbiota and its modulation for oral health. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 99, n. September 2017, p. 883–893, 2018.

9 Anexos

9.1 Anexo 1. Aprovação do comitê de ética.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 842.143

Os exames laboratoriais serão exames de rotina das pacientes no HSP? Para a pesquisa, quais os exames que serão realizados? favor verificar os custos que o HSP arcará.

RESPOSTA: A pesquisa envolverá financiamento governamental. PENDÊNCIA ATENDIDA

Apresentar carta de ciência/autorização da Coordenadoria de Ensino e Pesquisa do HU/HSP para a realização da pesquisa

RESPOSTA: Apresentada aprovação da Coordenadoria de Ensino e Pesquisa do HU/HSP para a realização da pesquisa. PENDÊNCIA ATENDIDA

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

SAO PAULO, 22 de Outubro de 2014

Assinado por:
José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

Página 02 de 02

9.2 Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

- 1- PROJETO: “Avaliação da microbiota intestinal e sua relação com o Diabetes Mellitus Gestacional”;
- 2- O objetivo deste estudo é avaliar e comparar o padrão da microbiota intestinal de gestantes com e sem DMG e de não-gestantes.
- 3- Será realizada a identificação clínica e laboratorial da diabetes gestacional e do grupo controle (sem doença) e coleta de 15 mL de sangue por punção periférica da veia do antebraço;
- 4- Este procedimento poderá causar um pouco de dor na punção e a formação de equimose ou hematoma (mancha arroxeadada que desaparece em alguns dias) no local, embora isto não seja frequente.
- 5- Após assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você será convidada a responder um questionário sócio demográfico.
- 6- Não há benefício direto para o participante. Trata-se de um estudo epidemiológico testando a hipótese de que pacientes com diabetes gestacional apresentam alterações da resposta imune materno-fetal. Somente no final do estudo poderemos concluir se existe ou não alguma alteração que pode ser relacionado ao diabetes gestacional;
- 7- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é Dra. Silvia Daher que pode ser encontrada na Rua Pedro de Toledo, 669 – 9º andar, frente 5576-4962 / 5579-2353. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar-cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162; e-mail: cepunifep@epm.br
- 8- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 9- Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11- Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;

12- Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

13- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

14 - Este termo está sendo disponibilizado em 2 vias originais, uma ficará com o participante da pesquisa e a outra com o pesquisador.

15 - Todas as folhas deverão ser rubricadas (assinadas) pelo pesquisador e pela participante no momento da aplicação do termo de consentimento.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação da microbiota intestinal e sua relação com o Diabetes Mellitus Gestacional”. Eu discuti com a Dra Silvia Daher sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data: ____ / ____ / ____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data: ____/____/____

9.3 Anexo 3: Ficha de dados Sócio-Demográficos

Coleta de dados:

Data: ____/____/____ Responsável pela coleta: _____

Local da coleta: _____

_____ Encaminhado
de: _____

Coletado em: () Jejum ____ horas

() 1 hora pós ingestão de 75g de glicose

() 1 hora pós ingestão de 75g de glicose

Identificação:

Nome: _____ RH-HSP

Endereço: _____

CEP: _____ Natural: _____

Telefone: _____ / Celular: _____

_____ / _____

Idade: _____ Escolaridade: _____

Profissão: _____

Estado civil: () casada () união consensual () solteira () Outras: _____

Cor/Raça (auto-declarada):

Paciente: () branca () negra () parda () indígena () asiática

Pai: () branca () negra () parda () indígena () asiática

Mãe: () branca () negra () parda () indígena () asiática

Avó Materna: () branca () negra () parda () indígena () asiática

Avô Materno: () branca () negra () parda () indígena () asiática

Avó Paterna: () branca () negra () parda () indígena () asiática

Avô Paterno: () branca () negra () parda () indígena () asiática

Antecedentes Familiares

Tem parentes de 1º grau com diabetes? () Não () Sim

Se sim, quem? _____ Desde quando?

Antecedentes Pessoais:

Tabagismo () Não () Sim Frequência: _____

Etilismo () Não () Sim Frequência: _____

Antecedentes Clínicos:

Doença durante a gestação atual: () Não () Sim

Faz uso de medicação? () Não () Sim

Internações clínicas: () Não () Sim

Transfusão sanguínea: () Não () Sim

Hábito intestinal: () Normal () Alterado

Intercorrências obstétricas até o momento: () Não () Sim

Antecedentes Obstétricos

Ano	Gestação	Tipo de parto	Sexo	Peso ao nascer	Intercorrências Maternas	Intercorrências Neonatais

Idade Gestacional na data da coleta:

DUM : ____ / ____ / ____

IG atual baseada na DUM: ____ semanas

Data do 1º US: ____ / ____ / ____

IG no 1º US: ____ semanas

IG atual baseada em 1ª US: ____ semanas

Exame Físico Data: ____ / ____ / ____

Peso Pré- gestacional: ____ Kg Altura ____ m IMC pré-gestacional ____ Kg/m²

Peso atual ____ Kg

Pressão arterial ____ x ____ mmHg

Exames Laboratoriais:

Glicemia jejum ____

Curva glicêmica -75g realizada em ____ / ____ / ____ com IG de ____ semanas

Resultado: Jejum ____ 1h ____ 2h ____

Segunda curva glicêmica -75g realizada em ____ / ____ / ____ com IG de ____ semanas

Resultado: Jejum ____ 1h ____ 2h ____

Hemograma:

Eritrócitos		Leucócitos	
Hemoglobina		Monócitos	
Hematócrito		Linfócitos	
VCM		Basófilos	
HCM		Neutrófilos	
CHCM		Eosinófilos	
Plaquetas			

Perfil Lipídico	
Colesterol total	
HDL colesterol	
LDL colesterol	
Triglicerídeos	

Hemoglobina Glicada	
Glicemia de Jejum	
Insulina	

Resultado perinatal:

Dados coletados em ____/____/____ por: telefone () ficha do HSP ()

Data do parto: ____/____/____ Idade gestacional: _____ semanas

Local: () Hospital São Paulo () Outros _____

Tipo: () Normal () Fórcepe () Cesariana Indicação: _____

Sexo do RN: M () F () Peso ao nascer: _____ g () AIG () GIG () PIG

RN – Alta com intercorrências: Não () Sim () Qual? _____

Tempo de internação do RN: _____ dias

9.4 Anexo 4: Currículo lattes

07/03/2019



Luiz Gustavo Sparvoli

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4082946810028761>
Última atualização do currículo em 12/11/2018

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Luiz Gustavo Sparvoli)

Mestrando do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF- USP) atuando com caracterização da Microbiota vaginal em gestantes e doenças infectocontagiosas do trato genital feminino. Graduado em Obstetrícia na Universidade de São Paulo (USP) na Escola de Artes Ciências e Humanidades (EACH). Foi estagiário no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP), Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, no laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto, participou da liga de prevenção e tratamento da infecção por HIV/Aids FMUSP, Foi voluntário no atendimento de pacientes portadores da infecção por HIV na casa da AIDS, Estagiário do Hospital Municipal e Maternidade Amador Aguiar em assistência ao Parto Normal e Monitor da disciplina de Estágio Curricular II e III (assistência ao parto normal) no Hospital Municipal e Maternidade Amador Aguiar. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Luiz Gustavo Sparvoli 
Nome em citações bibliográficas SPARVOLI, L. G.; SPARVOLI, LUIZ G.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2017 Mestrado em andamento em Fisiopatologia.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF- USP, Brasil.
Título: Quantificação de lactobacillus sp. na microbiota vaginal de mulheres no período gravídico., Orientador:  Carla Taddei de Castro Neves.
Palavras-chave: Microbiota; Microbioma vaginal; Microbiota vaginal; Infecções do trato genital feminino.
Grande área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada / Especialidade: Microbiologia Médica.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Fisiopatologia e diagnóstico laboratorial.
Graduação em Obstetrícia.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2016 Ensino Médio (2º grau).
2007 - 2009 EE. ALBINO CESAR, A.B, Brasil.

Formação Complementar

2012 - 2014 Estágio. (Carga horária: 800h).
Instituto de Ciências Biomédicas- USP, ICB- USP, Brasil.
2012 - 2014 Liga de Prevenção e Tratamento à Infecção por HIV/ AIDS. (Carga horária: 160h).
Faculdade de Medicina, FM- USP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional
2017 - Atual Vínculo: , Enquadramento Funcional:

Instituto de Ciências Biomédicas- USP, ICB- USP, Brasil.

Vínculo institucional
2012 - 2014 Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 15
Outras informações Atuou como estagiário no departamento de biologia celular e do desenvolvimento no laboratório de cito-fisiologia do trofoblasto, auxiliando na realização de experimentos de trabalhos de pesquisa. Todas as atividades eram supervisionadas por doutorandos do laboratório. Responsável pela manutenção das linhagens de células utilizadas no laboratório. Iniciou projeto de pesquisa a nível de iniciação científica, projeto que avaliaria a expressão de moléculas de adesão em cultura de células endometriais de camundongos, entretanto, devido a problemas no biotério do departamento não foi possível continuidade da pesquisa.

Projetos de pesquisa

2017 - Atual Caracterização e quantificação de lactobacillus na microbiota vaginal de gestantes no terceiro trimestres.
Descrição: Projeto busca caracterizar através de metagenoma a microbiota vaginal de gestantes no terceiro trimestre de gestação além de quantificar diferentes espécies de lactobacillus e streptococcus agalactiae por qPCR.
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

2013 - 2014 Integrantes: Luiz Gustavo Sparvoli - Coordenador / Carla Taddei de Castro Neves - Integrante / Ramon Vitor Cortez de Godoy - Integrante.
Avaliação da Expressão de MUC 1 no Epitélio Endometrial de camundongos
Descrição: O projeto pretendia avaliar a expressão da proteína de adesão MUC1 em um modelo in vitro de epitélio endometrial de camundongos. (Projeto desativado devido a problemas com os animais do biotério).
Situação: Desativado; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Luiz Gustavo Sparvoli - Coordenador / Aline Lorenzon - Integrante.

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1.  CORTEZ, RAMON V.; TADDEI, CARLA R.; **SPARVOLI, LUIZ G.**; ÂNGELO, ANA G. S.; PADILHA, MARINA; MATTAR, ROSIANE; DAHER, SILVIA. Microbiome and its relation to gestational diabetes. *ENDOCRINE*, v. -, p. 1559-0100, 2018.

Resumos publicados em anais de congressos

1. DAHER, S.; Cortez, R. V.; TADDEI, C. R.; TRAINA, E.; **SPARVOLI, L. G.**; MATTAR, R. . COMPOSIÇÃO DAS MICROBIOTAS INTESTINAL, ORAL E VAGINAL NO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL. In: Congresso Paulista de Obstetria e Ginecologia, 2018, São Paulo. Anais do XXIII Congresso Paulista de Obstetria e Ginecologia., 2018. p. 117 - 119.
2.  DAHER, S.; Cortez, R. V.; **SPARVOLI, L. G.**; MATTAR, R.; TRAINA, E.; TADDEI, C. R. . CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL NA GESTAÇÃO: RESULTADOS PRELIMINARES. In: Congresso Paulista de Obstetria e Ginecologia, 2018, São Paulo. Anais do XXIII Congresso Paulista de Obstetria e Ginecologia, 2018. p. 117-117.

Apresentações de Trabalho

1. **SPARVOLI, L. G.**; Cortez, R. V.; TADDEI, C. R. . Characterization of vaginal microbiota and quantification of Lactobacillus sp. and Streptococcus agalactiae during pregnancy.. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology (ISPAT). 2018. (Simpósio).
2. XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Characterization of vaginal microbiota and quantification of Lactobacillus sp. and Streptococcus agalactiae during pregnancy.. 2018. (Congresso).
3. Workshop As Possibilidades e Limitações de Obstetras e Enfermeiros Obstetras na Assistência ao Parto Normal. 2014. (Congresso).
4. Cellular Components Coordinating the Maternal- Fetal Interface: Basic and Clinical cal Relevant Aspects for Gestational Intercurrences. 2013. (Congresso).
5. Curso da liga de prevenção e tratamento da infecção por HIV/Aids FMUSP. 2012. (Seminário).
6. Curso de Treinamento no Uso de Animais de Experimentação. 2012. (Outra).
7. Jovens e AIDS- Políticas Publicas e Comunicação. 2012. (Seminário).
8. "Global Trends in Midwifery: The Postmodern Midwife". 2011. (Seminário).
9. Congresso Médico Universitário da FMUSP. 2011. (Congresso).
10. Curso da liga de assistência multidisciplinar ao pré-natal da FMUSP. 2011. (Seminário).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 07/03/2019 às 14:48:09

9.5 Anexo 5: Ficha do aluno

07/03/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 7552152/1 - Luiz Gustavo Sparvoli

Email: luiz.sparvoli@usp.br
Data de Nascimento: 10/12/1991
Cédula de Identidade: RG - 38.774.746-1 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Obstetrícia - Escola de Artes, Ciências e Humanidades - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2017

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 24/01/2017
Início da Contagem de Prazo: 24/01/2017
Data Limite para o Depósito: 24/07/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Carla Taddei de Castro Neves - 24/01/2017 até o presente. Email: crtaddei@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 24/01/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 20/03/2018
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

1/4

07/03/2019

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 24/01/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019
Impresso em: 07/03/2019 14:44:10

2/4

07/03/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 7552152/1 - Luiz Gustavo Sparvoli

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-13/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	07/03/2017	19/06/2017	15	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MGO5730-8/1	Interações Hospedeiro-Bactérias em Saúde da Mulher (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	04/04/2017	17/04/2017	60	4	83	A	N	Concluída
BMM5747-7/4	Bioquímica Bacteriana (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	28/04/2017	30/06/2017	90	6	100	C	N	Concluída
FBC5719-4/1	Trato Gastrointestinal: Imunomodulação da Colonização e Infecção Bacteriana	04/08/2017	16/11/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	15/08/2017	27/11/2017	15	1	90	A	N	Concluída
ICB5709-6/5	Ensaios Pedagógicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/10/2017	07/11/2017	45	3	90	A	N	Concluída
FBA5906-2/1	Análise de Dados de Microbioma	26/02/2018	08/04/2018	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5793-14/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	05/03/2018	19/06/2018	15	1	75	A	N	Concluída
FBC5954-1/1	Redação de Trabalhos Científicos	12/04/2018	18/04/2018	15	1	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

3/4

07/03/2019

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Impresso em: 07/03/2019 14:44:10

4/4