

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Antonio Gomes de Amorim Filho**

**Efeito do pessário de Arabin e da progesterona natural  
na microbiota vaginal**

Versão original



**São Paulo**

**2023**

**ANTONIO GOMES DE AMORIM FILHO**

**Efeito do pessário de Arabin e da progesterona natural na  
microbiota vaginal**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Henrique  
Burlacchini de Carvalho

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Amorim Filho, Antonio Gomes de  
Efeito do pessário de Arabin e da progesterona  
natural na microbiota vaginal / Antonio Gomes de  
Amorim Filho. -- São Paulo, 2023.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.  
Orientador: Mário Henrique Burlacchini de  
Carvalho.

Descritores: 1.Trabalho de parto prematuro  
2.Colo do útero 3.Vaginose bacteriana 4.Metagenoma  
5.Microbiota 6.Descarga vaginal 7.Progesterona  
8.Pessários 9.Sequenciamento de nucleotídeos em  
larga escala

USP/FM/DBD-015/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*A meus pais, Antonio e Regina, exemplo de vida.*

*À minha família amada, Carolina, Antonio e Olivia,  
prova de amor e esperança no futuro.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu caríssimo orientador, Prof. Dr. Mário Burlacchini, profissional exemplar, grande amigo e parceiro desde minha chegada ao HCFMUSP, e a quem devo em grande parte minha formação como obstetra e especialista em Medicina Fetal.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zugaib, por me acolher como Médico Assistente da Clínica Obstétrica do HCFMUSP, motivo de orgulho pessoal e grande oportunidade de desenvolvimento profissional e acadêmico.

Às Profas. Dras. Rossana Francisco e Maria de Lourdes Brizot, pelo incentivo a que eu me engajassem neste Programa de Pós-graduação e, em especial, pela disponibilização de recursos do Laboratório de Fisiologia Obstétrica (LIM-57) da FMUSP para o financiamento desta pesquisa.

À minha banca de qualificação: Profas. Dras. Maria de Lourdes Brizot, Kátia Cândido Carvalho e Dra. Roberta Cristina Ruedas Martins, pelos numerosos e importantíssimos *insights* que possibilitaram a produção deste texto.

Às Dras. Stela Verzinhasse Peres e Elizabeth Patiño, pela monumental contribuição com as análises estatísticas.

A todos que, por sua valiosa ajuda, contribuíram para que esta pesquisa fosse realizada:

Dras. Monica Fairbanks de Barros, Juliana Codato Marinelli e Priscila Teixeira do Amaral, do Setor de Abortamento Habitual e Prematuridade da Clínica Obstétrica HCFMUSP.

Dra. Mara Hoshida, Ana Cristina Santos, Salet Terezinha de Souza e Isaias Vasconcelos Alves, do Laboratório de Fisiologia Obstétrica (LIM-57) da FMUSP.

Profa. Dra. Esther Sabino, Dra. Roberta Ruedas Martins, Dr. Lucas Franco e Roberto Ribeiro, do Laboratório de Parasitologia da FMUSP (LIM-46).

Por fim, à gentil Sra. Lucinda Cristina Pereira (Lucy), pela condução competente e atenta de todos os trâmites administrativos deste meu Doutorado.

*Todo problema virava uma questão a ser resolvida através da bateria. Ansiedade? Ah, se eu puder tocar cada vez mais lentamente, aniquilarei a ansiedade! (...) Percebi que, quanto mais se tem domínio sobre o andamento lento, mais maturidade musical se adquire. E isso vale para o resto das coisas da vida. Do sexo à conversa de botequim*

*(João Luiz Woerdenbag Filho)*

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>8</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Delineamento da pesquisa.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Ética.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3. Casuística.....</b>	<b>22</b>
4.3.1. Seleção de casos e critérios de inclusão.....	22
4.3.2. Randomização e grupos de estudo.....	23
<b>4.4. Coleta de dados e variáveis clínicas estudadas.....</b>	<b>24</b>
<b>4.5. Medida do Comprimento do Colo Uterino.....</b>	<b>25</b>
<b>4.6. Coleta e processamento das amostras de secreção vaginal.....</b>	<b>26</b>
<b>4.7. Análises convencionais da secreção vaginal.....</b>	<b>27</b>
<b>4.8. Sequenciamento 16S.....</b>	<b>28</b>
4.8.1. Extração do DNA bacteriano.....	28
4.8.2. Amplificação e purificação das sequências-alvo ( <i>amplicons</i> ).....	29
4.8.3. Preparo das bibliotecas e sequenciamento do DNA.....	31
4.8.4. Análise dos dados de sequenciamento.....	32
<b>4.9. Análise Estatística.....</b>	<b>33</b>
4.9.1. Análise Descritiva.....	33



4.9.2. Análise do conteúdo vaginal por métodos convencionais .....	33
4.9.3. Análise da composição da microbiota vaginal e classificação das amostras em tipos de comunidade (CSTs) .....	33
4.9.4. Análise da diversidade da microbiota vaginal .....	34
4.9.5. Análise de táxons específicos .....	35
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1. Caracterização da população .....</b>	<b>37</b>
5.1.1. História clínica e obstétrica .....	37
5.1.2. Coleta da secreção vaginal e medida do comprimento do colo uterino .....	39
5.1.3. Desfecho das gestações.....	40
<b>5.2. Caracterização da microbiota vaginal pelas análises convencionais e comparação entre os grupos de estudo .....</b>	<b>41</b>
<b>5.3. Caracterização da microbiota vaginal pelo sequenciamento 16S e comparação entre os grupos de estudo.....</b>	<b>43</b>
5.3.1. Composição e estabilidade da microbiota vaginal .....	43
5.3.2. Classificação das amostras em tipos de comunidade (CSTs) .....	47
5.3.3. Diversidade intra-amostra da microbiota vaginal (Diversidade Alfa) .....	49
5.3.4. Diversidade da microbiota entre as amostras estudadas (Diversidade Beta) .....	52
5.3.5. Correlação entre a abundância de táxons específicos e os grupos de estudo .....	54
<b>5.4. Correlação entre a microbiota vaginal e o escore de Nugent.....</b>	<b>56</b>
<b>5.5. Correlação entre a disbiose da secreção vaginal e o desfecho da gestação.....</b>	<b>60</b>
5.5.1. Descrição dos casos com parto prematuro na população estudada .....	60
5.5.2. Correlação entre a diversidade da microbiota vaginal e o desfecho da gestação....	61
5.5.3. Correlação entre a abundância de táxons específicos e o desfecho da gestação ....	62
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>72</b>
8.1. ANEXO A - Parecer substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	72
8.2. ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupos progesterona e pessário.....	75
8.3. ANEXO C – Sequências dos primers utilizados para sequenciamento da região V4 do gene 16S.....	78

<b>8.4. ANEXO D – Verificação da qualidade dos <i>amplicons</i> do gene 16S rRNA .....</b>	<b>79</b>
<b>8.5. ANEXO E – Verificação da qualidade do sequenciamento.....</b>	<b>80</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCOM: *analysis of composition of microbiomes*

ANCOM-BC: *analysis of composition of microbiomes with bias correction*

ASVs: *amplicon sequence variants*

BV: *bacterial vaginosis*

CST: *community state type*

FDR: *false discovery rate*

GEE: modelo de equações de estimação generalizadas

HCFMUSP: Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HIV: vírus da imunodeficiência humana

IG: idade gestacional

IMC: índice de massa corpórea

NGS: sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*)

OTU: unidade taxonômica operacional (*operational taxonomic unit*)

PCoA: *Principal Coordinates Analysis*

PERMANOVA: *permutational multivariate analysis of variance*

PCR: *polymerase chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)

QIIME (pronuncia-se “chime”): *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*

RN: recém-nascido

RPMO: rotura prematura de membranas ovulares

RR: risco relativo

rRNA: RNA ribossomal

SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TIMP-1: inibidor de tissular de metaloproteinases-1

TVUS: *transvaginal ultrasound*

USTV: ultrassonografia transvaginal

VA: vaginite aeróbia

VB: vaginose bacteriana

VPP: valor predictivo positivo

VPN: valor predictivo negativo

**LISTA DE SÍMBOLOS**

bp pares de bases

g grama

k/m<sup>2</sup> quilograma por metro quadrado

ml mililitros

mm milímetro

mg miligrama

ng nanograma

nm nanômetros

pM picomolar

μM micromolar

μl microlitros

> maior

≥ maior ou igual

< menor

≤ menor ou igual

± mais ou menos

∞ infinito

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1 - Composição da microbiota vaginal nos grupos Pessário e Progesterona. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 2 - Dominância de Lactobacillus na microbiota vaginal.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 3 - Classificação da microbiota vaginal em tipos de comunidades (CSTs).....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 4 - Estabilidade da composição da microbiota vaginal.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 5 - Diversidade alfa ao nível de gênero da microbiota vaginal na população de estudo. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 6 - Diversidade beta ao nível de gênero da microbiota vaginal na população de estudo. ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 7 - Comparação da abundância dos táxons majoritários entre os tempos de coleta T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub> nos grupos Pessário e Progesterona .....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 8 - Correlação entre a diversidade alfa ao nível de gênero da microbiota vaginal e as categorias do escore de Nugent.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 9 - Correlação entre a diversidade beta ao nível de gênero da microbiota vaginal e as categorias do escore de Nugent.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 10 - Abundância diferencial em relação às categorias do escore de Nugent.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 11 – Abundância diferencial de L.iners em relação ao parto prematuro.....</b>	<b>63</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 - Dados demográficos e história clínica da população em estudo – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018.....</b>	<b>38</b>
<b>Tabela 2 - Antecedentes obstétricos da população em estudo – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018.....</b>	<b>39</b>
<b>Tabela 3 - Variáveis associadas à coleta da secreção vaginal e medida do colo uterino em T<sub>0</sub> - – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 4 - Desfechos das gestações na população estudada – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 5 - Bacterioscopia e pesquisa de microorganismos específicos na secreção vaginal – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 6 - Características das gestantes que evoluíram para parto espontâneo com idade gestacional abaixo de 37 semanas – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabela 7 - Correlação entre a diversidade da microbiota vaginal e o desfecho da gestação – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018 .....</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 8 - Comparação entre a abundância dos táxons majoritários e o desfecho da gestação – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018 .....</b>	<b>62</b>

## RESUMO

Amorim Filho AG. Efeito do pessário de Arabin e da progesterona natural na microbiota vaginal [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**OBJETIVOS:** O presente estudo visou verificar a ocorrência de modificações na composição da microbiota vaginal decorrentes do uso do pessário de Arabin ou da progesterona natural por via vaginal como tratamento em gestantes com colo uterino curto diagnosticado entre 20 e 24 semanas de gestação. Os objetivos secundários foram a correlação entre diferentes tipos de análise da microbiota vaginal e a associação das modificações com a ocorrência do parto prematuro.

**MÉTODOS:** Análise prospectiva de 44 gestantes acompanhadas no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2018 devido ao achado de colo curto ( $\leq 25$  mm) ao USTV e tratadas com pessário de Arabin (n=22) ou progesterona vaginal (n=22). A secreção vaginal foi coletada no segundo trimestre, no momento do diagnóstico do colo curto, e no terceiro trimestre, 4 semanas após o início do tratamento. Foram realizadas análises microbiológicas convencionais nesse material para determinação do escore de Nugent e pesquisa de outros microorganismos específicos. Usando técnicas de sequenciamento do gene rRNA 16S bacteriano por NGS foi caracterizada a composição da microbiota vaginal nas 88 amostras colhidas. **RESULTADOS:** Não foi observada diferença associada ao tratamento em termos do escore de Nugent e outras análises microbiológicas, bem como com a composição, diversidade e abundância dos táxons majoritários pela análise metagenômica. A microbiota da maioria das amostras analisadas mostrou baixa diversidade, dominância de *Lactobacillus* e estabilidade entre os 2 tempos de coleta. O escore de Nugent alterado ( $>3$ ) associou-se à maior diversidade da microbiota, bem como à maior abundância de bactérias anaeróbias, como a *Gardnerella*. O parto prematuro abaixo de 37 semanas foi associado com a maior dissimilaridade da microbiota e com a diminuição da abundância de *Lactobacillus iners*. Não houve associação de outros desfechos gestacionais, RPMO e corioamnionite, bem como da presença de *slugde* cervical com a composição e diversidade da microbiota. **CONCLUSÃO:** Pessário e progesterona são equivalentes em relação à estabilidade da microbiota vaginal.

**Palavras-chave:** Trabalho de parto prematuro. Colo do útero. Vaginose bacteriana. Metagenoma. Microbiota. Descarga vaginal. Progesterona. Pessários. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala.



## ABSTRACT

Amorim Filho AG. Effect of the Arabin pessary and natural progesterone on the vaginal microbiota [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

**OBJECTIVES:** The aim of the present study was to investigate possible changes in vaginal microbiota composition due to the use of an Arabin pessary or vaginal progesterone in pregnant women with a short cervix ( $\leq 25$  mm) diagnosed at 20-24 wk. Secondary objectives were the comparison between different types of microbiota analyses and the correlation between changes in vaginal microbiota composition and the occurrence of preterm labor. **METHODS:** Prospective analysis of 44 pregnant women followed between Jan 2016-Dec 2018 for a short cervix ( $\leq 25$  mm) observed on TVUS and treated with an Arabin pessary (n=22) or vaginal progesterone (n=22). Vaginal swabs were collected at the 2<sup>nd</sup> trimester, upon short cervix diagnosis, and 4 weeks after treatment initiation. Microbiologic analyses were performed to determine the Nugent score of vaginal fluid as well as test for the presence of other specific microorganisms. Using high throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing techniques the microbiota of all 88 samples was determined. **RESULTS:** No treatment-associated difference in the Nugent score or other conventional microbiologic analysis was observed. Most samples were characterized by a low-diversity, lactobacilli-dominated microbiota composition that remained stable after the onset of treatment. An altered Nugent score ( $>3$ ) was associated with higher diversity and abundance of anaerobes, like *Gardnerella*. Premature birth before 37 wk was associated with a higher dissimilarity and lower abundance of *Lactobacillus iners*, but no other association was found with PROM, chorioamnionitis or the presence of cervical sludge. **CONCLUSION:** Pessary and progesterone treatment for a short cervix appear to be equivalent regarding stability of the vaginal microbiota.

**Keywords:** Obstetric labor, premature. Cervix uteri. Vaginosis, bacterial. Metagenome. Microbiota. Vaginal discharge. Progesterone. Pessaries. High throughput nucleotide sequencing.

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

O parto prematuro é definido como aquele que ocorre antes de 37 semanas completas de gestação e representa, nos dias atuais, uma importante causa de morbidade e mortalidade neonatal, com taxas em torno de 12-13% nos EUA (1). Um levantamento da Organização Mundial de Saúde estimou que a taxa de partos prematuros no Brasil em 2010 foi de 9,2%, resultando em aproximadamente 280 mil nascimentos prematuros (2). Os dados mais recentes disponibilizados pelo Ministério da Saúde mostram um incremento, com taxa de 11,6% no período 2012 a 2016 sendo que, somente no ano de 2016, houve 316.245 nascimentos antes das 37 semanas de gestação (3). Da mesma forma, analisando uma amostra representativa da população brasileira, o estudo *Birth in Brazil* estimou uma taxa de prematuridade de 11,5% no período 2011 a 2012 (4).

O parto prematuro pode ser classificado como *espontâneo*, quando as contrações se iniciam espontaneamente, podendo ser precedidas ou não pela rotura prematura de membranas ovulares, ou *eletivo*, quando realizado por indicações médicas maternas ou fetais. Estima-se que a prematuridade seja responsável por até  $\frac{3}{4}$  da mortalidade neonatal e em torno de metade da morbidade a longo prazo, ou seja, embora muitos recém-nascidos prematuros sobrevivam, é grande o risco de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e de complicações respiratórias e gastrointestinais. A gravidade das sequelas da prematuridade é inversamente proporcional à idade gestacional no parto e, dessa forma, o parto prematuro pode ser também classificado como *precoce*, quando ocorre antes das 34 semanas de gestação, e *tardio*, quando ocorre entre 34 e 37 semanas (5).

A fisiopatologia do parto prematuro não foi completamente elucidada, mas acredita-se que possa resultar tanto da ativação idiopática e precoce dos mecanismos normais de parturição quando de algum evento patológico desencadeante. Nesse sentido, sabe-se que processos inflamatórios na interface materno-fetal, coletivamente denominados de *ativação decidual*, constituem um importante mecanismo de iniciação do trabalho de parto, através de uma via comum envolvendo a liberação de prostaglandinas e proteases, a

qual resulta em alterações cervicais, rotura de membranas ovulares e contrações uterinas. Nas gestações de termo essa ativação é mediada por interações parácrinas materno-fetais. Por outro lado, no trabalho de parto prematuro, fenômenos patológicos cursando com distensão uterina, sangramento decidual ou a ocorrência de uma infecção intrauterina oculta seriam ser fatores desencadeantes da ativação decidual (1, 5, 6).

O fator de risco mais importante para a prematuridade é o antecedente de parto prematuro em gestação anterior. Outros fatores incluem os extremos de idade materna, etnia afrodescendente, abuso de drogas e tabaco, gestações múltiplas, anomalias uterinas, incompetência istmo-cervical e infecções sistêmicas ou genitais (1). Nesse último caso, estima-se que entre 25 e 40% dos casos de partos prematuros estejam associados à colonização da cavidade amniótica. Os micro-organismos mais comumente encontrados são os micoplasmas genitais, como, por exemplo, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*, além de outros colonizadores do trato gastrointestinal e genital inferior considerados como de baixa virulência, como *Streptococcus agalactiae* e *Fusobacterium nucleatum* (7). Embora tenham sido propostos vários mecanismos de colonização da cavidade amniótica, como, por exemplo, a via hematogênica a partir de foco periodontal (8), a rota certamente mais importante é a ascendente, a partir de infecções do trato genital inferior. Dessa forma, aparentemente, o processo inflamatório é crônico, progredindo lentamente na ausência de sinais e sintomas exuberantes de infecção (1).

Sabe-se ainda que a maioria dos partos prematuros ocorre em pacientes sem fatores de risco identificáveis, dificultando o desenvolvimento de estratégias de prevenção (5, 9). Por outro lado, atualmente, o achado de colo uterino curto à ultrassonografia transvaginal no segundo trimestre (entre 20 e 24 semanas de gestação) pode ser considerado como o mais importante preditor do risco de parto prematuro, independentemente de outros fatores clínicos. Assim, o risco aumenta conforme o comprimento do colo diminui no segundo trimestre, por exemplo, o risco associado ao comprimento do colo abaixo do percentil 10 (25 mm) fica entre 25 e 30%, podendo chegar até a 50% quando o comprimento do colo está abaixo do percentil 3 (10). Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo,

tendo sido demonstradas taxas de parto prematuro abaixo de 34 semanas entre 26 e 50% quando o comprimento do colo encontrava-se abaixo de 20 mm (11). Dessa forma, em gestações únicas, a medida do comprimento do colo uterino no segundo trimestre deve ser considerada como importante intervenção para a identificação de gestantes com risco de parto prematuro (12, 13), as quais podem se beneficiar de algumas medidas terapêuticas disponíveis, tais como o uso de progesterona natural por via vaginal (10, 13, 14, 15), a cerclagem uterina, nos casos onde há suspeita de incompetência cervical (16) e, como proposto mais recentemente, o uso do pessário vaginal (17, 18, 19). Recentemente foi também explorada a associação de pessário e progesterona na prevenção da prematuridade (20). Na prática clínica, mesmo que os resultados desses estudos sejam ainda conflitantes, em parte devido à heterogeneidade das populações estudadas (21, 22, 23), em nosso meio o uso de pessário vaginal para prevenção do parto prematuro é uma terapêutica difundida, comercialmente disponível e autorizada pelos órgãos de vigilância. Além disso, o uso do pessário é bem aceito pelas pacientes, embora tenha sido descrito o surgimento ou aumento da secreção vaginal, por vezes abundante, associado a esse tratamento (19), confirmando uma observação da prática rotineira com pacientes em uso de pessário.

No sentido de melhor esclarecer essa questão, está em curso no Hospital da Clínicas da FMUSP (NCT02511574, *clinicaltrials.gov*) um estudo clínico randomizado visando comparar o uso do pessário de Arabin com a progesterona natural por via na prevenção do parto prematuro numa população de gestantes com gestação única e colo uterino curto ( $\leq 25$  mm) no segundo trimestre da gestação. Considerando que a prematuridade é um fenômeno multifatorial e pode haver contribuição de infecções vaginais, foi elaborado o presente estudo a partir da população mencionada acima, cuja proposição foi verificar se ocorrem alterações da microbiota vaginal associadas ao uso da progesterona ou do pessário. Tais tratamentos poderiam ter efeitos deletérios, por perturbar a composição da microbiota vaginal, seja pela ação do medicamento, no caso da progesterona, ou pela presença do corpo estranho vaginal, no caso do pessário, expondo a gestante a um maior risco de infecções vaginais.

# OBJETIVOS

---

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo, que avalia uma população de gestantes com gestação única e colo uterino curto ( $\leq 25$  mm) entre 20 e 24 semanas, são:

Objetivo principal:

- Verificar, através de técnicas microbiológicas e metagenômicas, se ocorrem modificações na microbiota vaginal decorrentes do uso do pessário ou da progesterona natural via vaginal;

Objetivos secundários:

- Comparar a composição da microbiota vaginal com os resultados de testes convencionais para avaliação da microbiota vaginal (bacterioscopia e culturas específicas);
- Verificar a associação entre possíveis alterações da microbiota vaginal e a ocorrência do parto prematuro, bem como de outros eventos obstétricos adversos, como a rotura prematura de membranas ovulares e a corioamnionite.

# REVISÃO DE LITERATURA

---



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### ***Infecções vaginais estão associadas ao colo uterino curto e à prematuridade***

Classicamente, a flora vaginal normal é descrita como sendo constituída predominantemente por lactobacilos, cuja presença inibe a proliferação de outros micro-organismos patogênicos através da formação de um biofilme protetor, além da secreção de ácido láctico, que diminui o pH vaginal (24). A alteração da flora vaginal mais frequente é a vaginose bacteriana (VB), na qual a flora normal constituída predominantemente de lactobacilos é substituída por uma flora bacilar Gram-variável, não associada a resposta inflamatória local. Do ponto de vista microbiológico, a VB pode ser diagnosticada através da bacterioscopia da secreção vaginal com coloração de Gram (25).

Dessa maneira, foi demonstrado um aumento no risco de parto prematuro associado à presença de VB, definida através da bacterioscopia (26, 27, 28). Por exemplo, Carvalho et al. (28), estudando uma população de 611 gestantes acompanhadas no HCFMUSP, mostraram que a VB aumenta o risco de parto prematuro (RR) em 1,8 vezes. Apesar de ainda não completamente esclarecida, a fisiopatologia da VB no parto prematuro deve envolver a ascensão de bactérias à cavidade uterina no início ou mesmo antes da gestação (29, 30). Outra alteração da flora vaginal também associada a risco aumentado de parto prematuro é a vaginite aeróbia (VA), na qual, de maneira semelhante à VB, também se observa uma diminuição marcante do número de lactobacilos, porém com predomínio de flora cocóide facultativa e associada a resposta inflamatória intensa ao nível do epitélio (31, 32). De forma semelhante, outras infecções genitais foram associadas ao aumento do risco de parto prematuro, porém com estudos menos consistentes, por exemplo a tricomoníase (risco relativo – RR=1,3) (33), *Chlamydia* (RR=2) (34), sífilis e gonorreia (RR=2) (35).

Como já dito anteriormente, os micro-organismos mais comumente identificados no interior da cavidade uterina de mulheres com parto prematuro associado à infecção intra-amniótica são constituintes da flora do trato genital

inferior e gastrointestinal, o que favorece a hipótese de uma via ascendente de infecção (7).

Por outro lado, essa hipótese implica na transposição, por parte desses micro-organismos, da barreira química e mecânica constituída pelo tampão de muco cervical. Nesse sentido, presume-se que, na presença de colo uterino curto, devido à menor distância a ser percorrida e à menor quantidade de muco cervical, a cavidade amniótica estaria mais suscetível à colonização bacteriana. De fato, estudos envolvendo a análise microbiológica do líquido amniótico em gestantes com incompetência cervical e colo dilatado mostraram que a colonização bacteriana da cavidade amniótica é frequente, com taxas ao redor de 50% (36, 37). Nesse sentido, Romero et al. (38), através de análises microbiológicas e moleculares, demonstraram efetivamente que há coincidência entre as bactérias identificadas no líquido amniótico e na vagina de gestantes com corioamnionite clinicamente diagnosticada.

Dessa maneira, a presença de infecções genitais seria um elo importante de ligação na fisiopatologia do parto prematuro, ou seja, o colo uterino dilatado precocemente permitiria a colonização da cavidade amniótica por bactérias patogênicas, levando a processo inflamatório, ativação decidual e desencadeamento de contrações uterinas (39). Por outro lado, Donders et al. (40), em estudo examinando a evolução do comprimento do colo uterino entre o primeiro e o segundo trimestres da gestação e correlacionando com a presença de microbiota vaginal anormal e desfecho de parto prematuro numa população de 1026 gestantes, propuseram que a infecção vaginal no início da gestação pode não ser apenas um fator de risco para prematuridade quando associada ao colo uterino curto, como descrito acima, mas também representar uma causa direta do encurtamento do colo nessa fase.

### ***A introdução de técnicas de metagenômica melhorou a compreensão das alterações da flora vaginal***

Embora esteja documentada a associação entre o parto prematuro e presença de infecções genitais e/ou intra-amnióticas, sobretudo em casos de prematuridade extrema, os estudos mais antigos apresentam limitações. Por

exemplo, estudos baseados na identificação de micro-organismos por cultura necessitam de uma quantidade exaustiva de análises e, frequentemente, geram resultados incompletos. Nesse sentido, a introdução de técnicas moleculares para detecção do DNA de bactérias específicas, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), permitiu a identificação de micro-organismos minoritários ou de difícil crescimento em cultura (41).

Mais recentemente, o advento dos sequenciadores de DNA de nova geração, que permitem a leitura simultânea de uma enorme quantidade de dados de sequências de DNA, a um custo relativamente baixo, incrementou ainda mais os estudos de metagenômica, definida como a identificação de micro-organismos em uma amostra complexa diretamente através do DNA extraído, sem a necessidade de cultura. Dessa forma, sequenciando genomas bacterianos completos ou apenas regiões específicas, como as regiões hipervariáveis dos genes ribossomais 16S (rRNA 16S), e comparando as sequências obtidas com bancos de dados existentes, é possível a identificação e quantificação de todas as bactérias que compõem uma determinada amostra, o que é denominado análise de *microbioma* ou *microbiota*. Desde 2008, o *National Institutes of Health* americano financia o Projeto Microbioma Humano (*Human Microbiome Project*) (42), cuja intenção é definir a composição do microbioma de vários sítios do corpo humano, em indivíduos normais e em condições patológicas, como o parto prematuro (43), por exemplo. O conceito atual derivado dessa abordagem é de que a homeostase dependeria de interações complexas entre o indivíduo e seu microbioma, e cuja perturbação, denominada *disbiose*, estaria associada ao desenvolvimento de doenças. Portanto, a melhor compreensão da microbiota vaginal associada à prematuridade, poderia auxiliar na compreensão da fisiopatologia do parto prematuro, bem como no desenvolvimento de melhores estratégias de prevenção e tratamento (43, 44, 45, 46, 47).

***A microbiota vaginal normal de mulheres em idade reprodutiva pode ser classificada em 5 tipos principais e apresenta variação temporal e de acordo com a etnia***

Estudos iniciais em populações não selecionadas de mulheres não grávidas e em idade reprodutiva mostraram grande variabilidade na composição da microbiota vaginal, sendo que em aproximadamente metade dos casos havia predominância de lactobacilos, como seria esperado em situações não patológicas (41, 45, 48).

Analisando populações de mulheres norte-americanas de várias etnias, assintomáticas e não grávidas, Ravel et al. (49) (n=396) observaram que a microbiota vaginal podia ser classificada em 5 grupos fundamentais, ou CSTs (*community state types*), de acordo com a sua composição. Dessa forma, em 4 grupos havia predominância de espécies de *Lactobacillus*, CST-I (*L.crispatus*), CST-II (*L.gasseri*), CST-III (*L.iners*) e CST-V (*L.jensenii*), e um último grupo (CST-IV), caracterizado por uma composição heterogênea, sem domínio de lactobacilos e maior presença de bactérias anaeróbias, incluindo espécies associadas à VB. Além disso, foi demonstrada diferença significativa na distribuição dos CSTs segundo a etnia, sendo o CST-IV mais frequente nas pacientes de origem hispânica e negra. Nesse estudo também foi demonstrada a correlação entre o CST e o respectivo escore de Nugent e pH vaginal. Dessa forma, os grupos com predominância de *Lactobacillus* (CSTs I, II, III e V) estavam associados ao escore de Nugent mais baixo e menor pH vaginal, enquanto o CST-IV apresentava escores de Nugent e pH vaginal mais altos, sugerindo uma associação com a VB, ainda que sem correlação clínica, já que as mulheres eram assintomáticas.

Adicionalmente, Gajer et al. (50) mostraram que o CST-IV podia ser subdividido em 2 grupos, o CST-IV-A, e o CST-IV-B, este último contendo uma proporção maior de gêneros associados à VB, como *Atopobium*, *Gardnerella* e *Mobiluncus*, além de associado a escores de Nugent altos. Esse estudo comparou a composição da microbiota vaginal de 32 mulheres ao longo de um período de 16 semanas, demonstrando que algumas mulheres apresentam grande estabilidade da microbiota, enquanto outras apresentam mudanças

marcantes ao longo do tempo, e que tais transições dependiam fundamentalmente da composição inicial da microbiota vaginal, da fase do ciclo menstrual e da atividade sexual.

Outras correlações entre a composição da microbiota vaginal e determinados estilos de vida ou antecedentes clínicos, tais como tabagismo, obesidade, presença de doença associada e uso de antibióticos, embora plausíveis, ainda carecem de demonstração mais consistente (45).

### ***A microbiota vaginal em gestantes apresenta alta estabilidade, baixa diversidade e aumento da predominância de *Lactobacillus****

Utilizando o sequenciamento de regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S, uma série de estudos em populações de gestantes norte-americanas e europeias mostrou que a microbiota vaginal também podia ser classificada nos 5 grupos fundamentais quanto à composição (CSTs I a V). Dessa maneira, Aagaard et al. (51) (n=24, predomínio caucasiano), Romero et al. (52) (n=22, predomínio afrodescendente), Digiulio et al. (53) (n=34) e MacIntyre et al. (54) (n=42, predomínio caucasiano) demonstraram que, em comparação com mulheres não gestantes, a composição da microbiota vaginal em gestações não complicadas mostrava uma diminuição acentuada da diversidade de espécies, com predomínio ainda maior de *Lactobacillus*, sendo menor a frequência do CST-IV. Além disso, numa análise longitudinal dessas gestações foi demonstrada grande estabilidade da microbiota, com crescente diminuição da diversidade de espécies e aumento da abundância de *Lactobacillus* com a evolução da gestação.

Por outro lado, Romero et al. (52) observaram ao longo da gestação algumas transições entre composições dominadas por *Lactobacillus*, porém em nenhum caso houve mudança de CST com predominância de *Lactobacillus* para o grupo com alta diversidade (CST-IV).

De maneira interessante, Digiulio et al. (53) observaram que a estabilidade da microbiota durante a gestação ocorria em outros sítios do corpo, como a cavidade oral e trato intestinal. Todavia, segundo esses autores e,

também MacIntyre et al. (54), no período pós-parto ocorre aumento da diversidade e diminuição do predomínio de *Lactobacillus*.

A influência da etnia sobre a microbiota vaginal em gestantes foi investigada de maneira mais robusta por Serrano et al. (55). Comparando a microbiota vaginal de 613 gestantes não complicadas, amostradas nos 3 trimestres da gestação, com 1.969 controles não gestantes, esse estudo confirmou as observações anteriores de que, durante a gestação, diminui a diversidade da microbiota e aumenta a prevalência de tipos de composição dominados por *Lactobacillus*. Adicionalmente, foi observada uma predominância maior de *Lactobacillus iners* na gestação, em detrimento de outros táxons, como a *Gardnerella* e outras espécies de *Lactobacillus*. Ainda, considerando um subgrupo de 300 gestantes e 300 controles pareados por etnia, idade e *status* socioeconômico, essas mudanças na microbiota foram mais pronunciadas nas gestantes afrodescendentes do que nas populações de origem hispânica e europeia. Neste último grupo, inclusive, a diferença entre a microbiota de gestantes grávidas ou não foi mínima.

***Há associação entre mudanças na microbiota vaginal e o risco de parto prematuro, sendo descritos padrões específicos, ou assinaturas, as quais variam de acordo com a origem étnica da gestante. O risco do parto prematuro também está associado à perda da estabilidade do ecossistema vaginal.***

A associação entre a composição da microbiota vaginal e a ocorrência de parto prematuro tem sido abordada em uma série de estudos prospectivos, com coleta da secreção vaginal ao longo da gestação (56, 57, 58, 59, 60, 61, 62). A proposição seria a de que a disbiose associada à mudança da composição original ou a proliferação de algum micro-organismo em particular estivesse associada ao evento. Inicialmente, embora tenham sido demonstradas associações, alguns estudos obtiveram resultados divergentes, dificultando a identificação de uma assinatura específica da microbiota associada ao parto prematuro (63, 64).

Dessa forma, considerando a estrutura da microbiota vaginal (CSTs I a V), em estudos caso-controle, Romero et al. (56) (casos=18; controles=72; população de etnia predominantemente afro-americana) e Freitas et al. (62) (casos=46; controles=170; população de etnia predominantemente caucasiana), não foi demonstrada associação entre algum tipo específico de CST e o parto prematuro. Adicionalmente, o estudo de Romero et al. (56) não demonstrou associação entre a diminuição do conteúdo de *Lactobacillus* ou de aumento do conteúdo de *Gardnerella*, e o parto prematuro. De maneira semelhante, Hyman et al. (57) (n=88, domínio caucasiano) e Stout et al. (60) (n=77, domínio afrodescendente) também não demonstraram tal associação. No entanto, o estudo de Stout et al. (60) demonstrou, analisando amostras sequenciais ao longo da gestação, que o parto prematuro foi correlacionado com a perda da estabilidade e aumento da diversidade da microbiota.

Por outro lado, DiGiulio et al. (58), analisando a microbiota vaginal de maneira seriada, em uma coorte de 49 gestantes predominantemente de etnia caucasiana, demonstraram algumas assinaturas associadas ao parto prematuro: persistência de CST-IV, diminuição da abundância *Lactobacillus* e aumento da abundância de *Gardnerella* e *Ureaplasma*. Considerando que a relação entre a composição da microbiota vaginal e o risco de parto prematuro deveria refletir as características específicas da população estudada, como, por exemplo, a origem étnica, o mesmo grupo de pesquisa realizou outro estudo, dessa vez analisando 2 coortes de gestantes norte-americanas, uma de origem predominantemente caucasiana (30 partos de termo; 9 prematuros), derivada do estudo inicial de DiGiulio et al. (58), e outra de origem afrodescendente (55 partos de termo; 41 prematuros). Assim, Callahan et al. (59) demonstraram que as assinaturas anteriormente descritas foram replicadas na coorte caucasiana, mas não na coorte afrodescendente. Adicionalmente os autores observaram que a diminuição na abundância de *L.crispatus* foi associada ao maior risco de parto prematuro em ambas as coortes. Ao contrário, não foi observada associação do parto prematuro com a abundância de *L.iners*. A associação da *Gardnerella* com o parto prematuro restringiu-se a uma variante específica identificada, a G2, na coorte caucasiana. Os autores observaram ainda que as 2 coortes estudadas diferem significativamente quanto à abundância de alguns táxons, assim, na

coorte caucasiana há maior frequência de *L.crispatus* e menor frequência de *Gardnerella* em relação à coorte afrodescendente e vice-versa. Outro achado interessante é que foram observados 2 padrões de associação entre *Lactobacillus* e a *Gardnerella*: nas amostras de secreção vaginal com dominância de *L.crispatus* geralmente não há associação com *Gardnerella*, ou seja, esses micro-organismos são mutuamente excludentes; por outro lado, frequentemente foi observada a coexistência, mesmo com alta abundância, entre *L.iners* e *Gardnerella* em ambas as coortes estudadas, o que indicaria uma contribuição de *L.iners* para o risco de parto prematuro.

Nesse sentido, Kindinger et al. (61), analisando prospectivamente 161 gestantes, com predomínio de etnia caucasiana, mostraram que a dominância de *L.iners* (CST-III) na microbiota vaginal na idade gestacional de 16 semanas foi preditor do parto prematuro abaixo de 34 semanas (sensibilidade=67%; especificidade=71%; VPN=94%). Ao contrário, a dominância de *L.crispatus* (CST-I) foi preditora do parto acima de 34 semanas (sensibilidade=44%; especificidade=89%; VPP=97%). Os autores mostraram que a predominância de *L.iners* na secreção vaginal apresentava uma taxa de detecção do parto prematuro de 67%, o que seria comparável ao rastreamento do colo uterino no segundo trimestre da gestação, sugerindo que esta poderia no futuro representar um marcador importante na predição do parto prematuro.

Outros estudos reforçaram a ideia de que a associação entre a microbiota vaginal e o risco de parto prematuro difere conforme a origem étnica da população. Como dito anteriormente, Stout et al. (60) demonstraram que, em uma população afrodescendente (53 partos a termo; 24 partos prematuros), onde normalmente se observa uma composição com alta diversidade de espécies, esse risco estaria associado à diminuição da riqueza e diversidade da microbiota. Ao contrário, Freitas et al. (62), estudando uma população predominantemente caucasiana (170 partos a termo; 46 partos prematuros), onde normalmente predomina a composição com baixa diversidade e dominância de *Lactobacillus*, o parto prematuro foi associado à maior riqueza e diversidade da microbiota. Ou seja, sob um ponto de vista ecológico, seria possível concluir que, mais do que a presença de um micro-organismo em particular ou de uma composição específica, a disbiose e, por consequência, o



risco do parto prematuro estaria associada à perda da estabilidade da microbiota vaginal.

Recentemente, Fettweis et al. (65), partindo do banco de dados do *Human Microbiome Project*, estudaram uma coorte de 135 gestantes (90 partos a termo; 45 partos prematuros) de etnia predominantemente afrodescendente. A análise longitudinal da microbiota vaginal nessa coorte mostrou que o parto prematuro está associado a uma redução marcada na abundância de *L.crispatus* no primeiro trimestre da gestação. Ao contrário, o conteúdo de *L.iners* não apresentou diferença entre os 2 grupos. Adicionalmente, o estudo identificou uma série de táxons cuja abundância no primeiro trimestre se relacionou positivamente com o parto prematuro, como a *Gardnerella vaginalis*, por exemplo. Em particular, foram identificados 4 táxons preditivos do parto prematuro: *Sneathia amnii*, BVAB1, TM7-H1 e *Prevotella cluster2*.

Em outro estudo recente, Feehily et al. (66) utilizaram uma metodologia de sequenciamento massivo (*shotgun sequencing*) para estudar a microbiota vaginal de uma população europeia, de origem caucasiana (90 partos a termo; 45 partos prematuros), e observaram que, embora não houvesse diferença entre os grupos quanto à diversidade da microbiota, houve correlação entre o conteúdo de *L.crispatus* e o grupo que evoluiu para parto a termo.

***A dominância de Lactobacillus iners na secreção vaginal pode estar associada à disbiose devido à instabilidade da composição e à maior produção de L-lactato***

Alguns estudos atuais suportam a hipótese de que a microbiota vaginal com dominância de *L.iners* seria uma composição instável e, portanto, representaria uma flora de transição, seja na progressão para uma composição normal ou para uma situação patológica, como a VB (67).

Por exemplo, Kindinger et al. (61), demonstraram que as gestantes em cuja microbiota vaginal havia dominância de *L.iners* no início do segundo trimestre foram mais propensas a apresentar mudanças na composição ao longo da gestação, ou seja, a microbiota associada ao CST-III foi mais instável.

Acredita-se que a função protetora dos *Lactobacillus* contra microorganismos patogênicos seja exercida em grande parte pela produção de ácido láctico, com consequente acidificação do ambiente vaginal (24). Por outro lado, bactérias produtoras de ácido láctico secretam ambos os isômeros ópticos D- e L-lactato, os quais podem ter efeitos diversos. Por exemplo, foi demonstrado que em mulheres com microbiota vaginal com predominância de *L.iners* ocorre preferencialmente a produção do L-lactato, o qual tem efeito ativador de metaloproteinases da matriz extracelular da mucosa vaginal, com potencial envolvimento nos mecanismos de alteração cervical. Ao contrário, esse efeito não foi observado em mulheres com flora vaginal com predominância de *L.crispatus*, nas quais, além da maior produção de ácido láctico total, ocorre preferencialmente a secreção do D-lactato (68). De maneira semelhante, estudos *in vitro* demonstraram que na presença de altas concentrações de D-lactato associadas ao *L.crispatus* ocorre maior retenção de partículas virais do vírus da imunodeficiência humana (HIV) no muco cervical, enquanto que em baixas concentrações associadas ao *L.iners* ocorre maior difusão do vírus pela mucosa cérvico-vaginal (69). Por fim, também foi demonstrado que o *L.iners* induz a secreção de uma série de fatores pró-inflamatórios em células epiteliais vaginais em cultura enquanto que o *L.crispatus* não tem esse efeito (70, 71).

Portanto, essas evidências sugerem que a dominância de *L.iners* na secreção vaginal poderia estar associada a mecanismos modulatórios que perturbariam a barreira química e mecânica do muco cervical, expondo o colo à infecção ascendente e consequente risco de parto prematuro (72).

Essa hipótese foi examinada por Witkin et al. (73), estudando 340 gestantes brasileiras, de etnia mista, no segundo trimestre da gestação, no momento do exame de rastreio do comprimento do colo uterino. Examinando as associações entre o CST e a dosagem de biomarcadores na secreção vaginal, os autores propuseram um modelo em que os CSTs III e IV são preditores indiretos do encurtamento do colo uterino, via alteração nas concentrações de D-lactato e do inibidor de tissular de metaloproteinases-1 (TIMP-1).

Outros estudos também reportaram associações semelhantes entre a microbiota e vias bioquímicas. Por exemplo, Fettweis et al. (65) observaram que a disbiose da microbiota associada ao parto prematuro está também associada

à maior expressão de citocinas pró-inflamatórias. De maneira semelhante, Feehily et al. (66) descreveram várias associações de processos bioquímicos e com a microbiota vaginal relacionada ao parto prematuro.

***A disbiose da flora vaginal está associada e pode, inclusive prever a ocorrência de rotura prematura de membranas ovulares (RPMO)***

Aproximadamente 1/3 dos partos prematuros é precedido pela RPMO e esse evento foi correlacionado a alterações da microbiota vaginal em alguns estudos. Por exemplo, Jayaprakash et al. (74), analisando uma população canadense, de predomínio caucasiano (n=36), e Brown et al. (75), estudando uma população semelhante de gestantes inglesas (n=39), demonstraram que em gestantes com RPMO era mais frequentemente observada microbiota vaginal com diminuição da abundância ou mesmo depleção de *Lactobacillus*, além do aumento da diversidade da composição. De forma semelhante, alguns gêneros foram mais frequentemente observados na vigência de RPMO, por exemplo, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Prevotella* (74, 75). Essa disbiose mantinha-se após a RPMO e, curiosamente, era exacerbada pela profilaxia de infecção ascendente com eritromicina, inclusive, sendo relacionada ao maior risco de sepse neonatal (75). Analisando a microbiota vaginal sequencialmente, Brown et al. (76) mostraram ainda, na mesma população (n=60), que a RPMO associa-se à instabilidade da composição da microbiota e que a transição para uma composição com maior diversidade pode ser detectada já a partir do segundo trimestre da gestação.

***Foi demonstrada disbiose da secreção vaginal associada à cerclagem do colo uterino, porém o uso do pessário de Arabin e da progesterona parece não ter influência na composição da microbiota vaginal***

Como já descrito anteriormente, a proposição inicial deste estudo foi verificar se havia alteração da microbiota vaginal em gestantes decorrente da administração de progesterona por via vaginal ou uso do pessário de Arabin. A hipótese de disbiose da microbiota vaginal relacionada à presença de um corpo estranho foi inicialmente levantada em gestantes submetidas à cerclagem do colo uterino por incompetência cervical. Dessa forma, Kindinger et al. (72) demonstraram em uma população inglesa que, em gestantes submetidas a cerclagem por encurtamento do colo uterino no segundo trimestre, a utilização de fio de sutura multifilamento (n=25) está relacionada à redução da abundância de *Lactobacillus*, aumento da diversidade da microbiota, aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da vascularização do colo num período de até 16 semanas após a cirurgia. No entanto, a utilização de fio monofilamento (n=24) não teve a mesma influência na composição da microbiota vaginal, indicando um possível benefício no uso desse tipo de sutura.

De maneira semelhante, em outro estudo com gestantes inglesas, com predomínio de etnia afrodescendente, submetidas à cerclagem de emergência (n=20), onde foi observada a dilatação do colo uterino ao exame físico e consequente exposição das membranas ovulares ao ambiente vaginal, Brown et al. (77) observaram que, embora houvesse redução da abundância de *Lactobacillus* associada à dilatação precoce do colo uterino, a inserção de uma sutura monofilamento no colo uterino não alterou significativamente a composição da microbiota vaginal. Foi ainda observado que altos níveis de *Gardnerella* na secreção vaginal associavam-se à presença de sintomas e ao insucesso da cerclagem.

Recentemente, Vargas et al. (78), analisando uma população europeia de etnia mista, com predomínio caucasiano, submetida ao uso do pessário (n=24) ou cerclagem (n=19) por encurtamento do colo uterino no segundo trimestre, e comparando com um grupo controle com colo normal (n=35), demonstraram que

a cerclagem está associada com a diminuição da abundância de *Lactobacillus* e aumento da diversidade da microbiota. Por outro lado, o uso do pessário não teve o mesmo impacto na microbiota vaginal.

Quanto ao uso de progesterona vaginal, Kindinger et al. (61) demonstraram em uma população semelhante ao estudo acima que, em comparação com um grupo controle (n=42), gestantes que fizeram uso de progesterona vaginal por achado de colo curto no segundo trimestre (n=25), não apresentaram mudanças significativas na composição e diversidade da microbiota vaginal e, inclusive, sugeriram um efeito benéfico desse tratamento nos casos com disbiose da secreção vaginal devido à ação anti-inflamatória do medicamento.

# MÉTODOS

---

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Delineamento da pesquisa

O presente estudo foi um braço do estudo clínico randomizado, atualmente em curso na Clínica Obstétrica do HCFMUSP (NCT02511574, *clinicaltrials.gov*), visando comparar o uso do pessário de Arabin com o da progesterona natural por via vaginal para prevenção de prematuridade em gestantes com colo uterino curto no segundo trimestre da gestação. Trata-se de um estudo descritivo, com amostra de conveniência, incluindo 44 gestantes acompanhadas no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2018.

### 4.2. Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP em 06/11/2013, sob o número CAAE 20611813.0.0000.0068 e parecer número 470.095 (**Anexo A**).

Todas as gestantes incluídas no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo B**).

### 4.3. Casuística

#### 4.3.1. Seleção de casos e critérios de inclusão

Por ocasião da ultrassonografia morfológica entre 20 e 24 semanas de gestação, gestantes referidas ao ambulatório de ultrassonografia da Clínica Obstétrica do HCFMUSP, provenientes do pré-natal da instituição ou da rede pública de saúde, foram submetidas à avaliação do comprimento do colo uterino pela ultrassonografia transvaginal (USTV). Aquelas com medida do colo uterino

≤25 mm e que se enquadravam nos critérios de inclusão foram convidadas a participar do estudo e, após a assinatura do TCLE, realizaram seguimento pré-natal no grupo de abortamento habitual da Clínica Obstétrica HCFMUSP, de acordo com a rotina do serviço.

Os critérios de inclusão foram:

- Datação correta da gestação, com ultrassonografia de 1º trimestre ou duas ultrassonografias entre 16 e 20 semanas confirmando a idade gestacional;
- Gestantes entre a 20 e 24 semanas de gestação;
- Feto único;
- Integridade das membranas ovulares;
- Ausência de malformações fetais maiores, definidas como malformações letais ou aquelas que necessitem de cirurgia peri ou pós-natal, ou óbito fetal;
- Ausência de suspeita clínica de incompetência cervical, como malformações uterinas, antecedentes de cirurgia do colo uterino e antecedente de abortamentos de repetição no segundo trimestre.

#### 4.3.2. Randomização e grupos de estudo

As gestantes selecionadas para o estudo foram alocadas em 2 grupos, na proporção de 1:1, utilizando-se um algoritmo de randomização desenvolvido com o *software* estatístico R (79), o grupo **Pessário** (n=22), em cujas participantes foi inserido o pessário de Arabin (Medical Software, RS), e o grupo **Progesterona** (n=22), cujas participantes receberam 200 mg de progesterona natural micronizada (Evocanil™, Zodiac, SP) ao dia. O tratamento foi iniciado no momento da randomização e continuado até 37 semanas de gestação ou até o parto, o que primeiro ocorresse.



#### 4.4. Coleta de dados e variáveis clínicas estudadas

Os dados pessoais, antecedentes e demais variáveis da gestação foram anotados em formulário eletrônico padronizado (Excel, Microsoft Corporation, USA). Os dados de parto foram obtidos mediante busca no prontuário médico do HCFMUSP, busca nos bancos de dados eletrônicos da Clínica Obstétrica do HCFMUSP e telefonemas às gestantes, quando o parto ocorria em outro serviço.

As variáveis estudadas foram:

Características da população:

- Idade materna (anos);
- Cor (branca/não branca);
- Nível educacional (fundamental/médio/superior);
- Índice de massa corpórea (IMC);
- Tabagismo (sim/não);
- Doença associada.

Antecedentes obstétricos:

- Nuliparidade (sim/não)
- Antecedente (sim/não) e número de abortamentos;
- Antecedente (sim/não) e número de partos prematuros abaixo de 34 semanas;
- Antecedente (sim/não) e número de partos prematuros entre 34 e 37 semanas;
- Antecedente (sim/não) e número de partos a termo.

Variáveis da gestação:

- Idade gestacional (IG) na coleta da secreção vaginal (semanas);
- Comprimento do colo uterino (mm);
- Presença de *sludge* intra-amniótico (sim/não);
- Uso de antibióticos precedendo a coleta em até 2 semanas (sim/não);
- Manipulação vaginal (exames de toque ou USTV) precedendo a coleta em até 1 dia (sim/não);

- Escore de Nugent da secreção vaginal (normal/intermediário/VB ou normal/alterado);
- Presença de fungos e *Trichomonas vaginalis* na secreção vaginal (sim/não);
- Presença de *Chlamydia tracomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* na secreção endocervical (sim/não);
- Presença de *Streptococcus agalactiae* na mucosa vaginal e perianal (sim/não).

Desfecho da gestação:

- Idade gestacional do parto (semanas);
- Via de parto (vaginal/cesárea);
- Trabalho de parto espontâneo (sim/não);
- Rotura prematura de membranas ovulares (sim/não);
- Diagnóstico de corioamnionite (sim/não);
- Peso do recém-nascido (g).

#### **4.5. Medida do Comprimento do Colo Uterino**

A medida do comprimento do colo uterino foi realizada de acordo com as recomendações da Fetal Medicine Foundation (80), utilizando aparelhos de ultrassonografia dos modelos Voluson E8 Expert™ ou Voluson 730 Expert™ (GE, Áustria), e transdutor endocavitário de 6mHz com 90° de campo visual. Brevemente, após esvaziamento vesical e com a gestante em posição ginecológica, o transdutor, protegido com preservativo contendo gel interna e externamente, foi posicionado no terço externo da vagina para obtenção do corte sagital do colo uterino. Foram identificados os orifícios cervicais interno e externo, o canal e a mucosa endocervical (linha hiperecogênica no canal cervical). O comprimento do colo foi então medido linearmente entre os orifícios externo e interno, delimitados pelo início e fim da mucosa endocervical ecogênica, evitando pressão excessiva no colo uterino para não provocar falso alongamento do colo.

#### 4.6. Coleta e processamento das amostras de secreção vaginal

De maneira semelhante ao descrito acima, foram coletadas amostras de secreção vaginal em 2 ocasiões, a primeira logo após a randomização, na primeira consulta de pré-natal e imediatamente antes da inserção do pessário ou do início do tratamento com a progesterona ( $T_0$ ), e a segunda com intervalo de 4 semanas da primeira coleta ( $T_1$ ), na segunda visita ao pré-natal.

As gestantes foram submetidas ao exame especular com espéculo vaginal estéril e lubrificado com solução salina estéril, sendo colhida uma amostra da secreção vaginal com escova plástica compreendendo as paredes laterais, o fundo de saco posterior e o canal endocervical. A amostra foi transferida para tubo coletor estéril tipo Falcon contendo 2 ml de solução salina a 0,9%, mantida a 4 °C por até 4 horas e então dividida em 2 alíquotas de 1 ml, estocadas a -70 °C para posterior extração do DNA.

Paralelamente, foram coletadas outras amostras da secreção vaginal para realização das análises microbiológicas convencionais, conforme a rotina do serviço:

- Secreção do fundo de saco posterior, com haste de ponta de algodão, em meio de transporte sólido (Stuart), para realização da bacterioscopia;
- Secreção do fundo de saco posterior, com escova plástica, em 1 ml de solução salina a 0,9%, para pesquisa de fungos e *Trichomonas vaginalis*;
- Secreção do canal endocervical, com haste de ponta de algodão ou escova plástica, em meios de transporte sólido (Stuart) ou líquido (Qiagen, USA ou Abbott, USA) apropriados, para pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

Adicionalmente, na 35ª semana de gestação, foi coletado swab da mucosa do introito vaginal e da região perianal em meio de transporte sólido (Stuart), para pesquisa de *Streptococcus agalactiae*.

#### 4.7. Análises convencionais da secreção vaginal

A bacterioscopia da secreção vaginal foi realizada pelo esfregaço e coloração de Gram, com atribuição do escore de Nugent (25), sendo a amostra classificada como Normal (escore 0-3), Intermediária (escore 4-6) e compatível com VB (escore  $\geq 7$ ), conforme descrito no **Quadro 1**.

**Quadro 1- Classificação de Nugent para esfregaço de secreção vaginal corado pelo Gram**

Tipo morfológico	<i>Lactobacillus</i> (bacilo G+ grande)	<i>Gardnerella</i> (bacilo Gv pequeno) <i>Bacterioides</i> (bacilo G- pequeno)	<i>Mobiluncus</i> (bacilo Gv curvo)
Escore <sup>a</sup>	0 para >30 1 para 15 a 30 2 para 1 a 14 3 para <1 4 para 0	0 para 0 1 para <1 2 para 1 a 4 3 para 5 a 30 4 para >30	0 para 0 1 para <5 2 para $\geq 5$
Escore total <sup>b</sup>	0 a 3 4 a 6 $\geq 7$	normal intermediário VB	

Adaptado de Nugent et al. (1991). *J Clin Microbiol.* **29** (2):297-301.

<sup>a</sup> média da contagem do número de tipos morfológicos por campo de magnificação x1.000

<sup>b</sup> soma dos 3 escores individuais por tipo morfológico

G+, Gram positivo; G-, Gram negativo; Gv, Gram variável; VB, vaginose bacteriana

A pesquisa de fungos e *Trichomonas vaginalis* foi realizada por exame a fresco da secreção em solução salina (81).

A pesquisa de *Chlamydia trachomatis* foi realizada pela pesquisa do DNA bacteriano por captura híbrida, usando o teste *Digene* HC2 CT-ID (Qiagen, USA) (82) ou por reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR), usando o ensaio Abbott RealTime CT/NG (Abbott, USA) (83).

Finalmente, a pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* foi realizada por método molecular, usando o ensaio Abbott RealTime CT/NG (Abbott, USA) (83), ou pela semeadura em meio de cultura Thayer-Martin ou ágar-chocolate (81).

Todas as análises acima foram realizadas pela Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP.

#### 4.8. Sequenciamento 16S

A caracterização da microbiota vaginal foi realizada pela amplificação e sequenciamento do domínio hipervariável V4 do gene rRNA 16S bacteriano a partir das amostras de secreção vaginal previamente estocadas, de acordo com protocolos descritos anteriormente (50, 52, 58, 84), com algumas adaptações. Dessa forma, para a amplificação do fragmento-alvo por PCR, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) F515 (5'-CACGGTTCGKCGGCCATT-3') e R806 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), sendo esses modificados para conter as sequências dos adaptadores de sequenciamento da plataforma Ion Torrent PGM (ThermoFisher, USA), técnica denominada *primer fusion*. Além disso, o *primer* F515 foi ainda acoplado a uma série de sequências identificadoras (*barcodes*), permitindo o sequenciamento simultâneo de até 32 amostras. As sequências completas dos *primers* utilizados, incluindo adaptadores e *barcodes*, estão descritas no **Anexo C**.

A etapa de extração de DNA foi realizada no Laboratório de Fisiologia Obstétrica (LIM-57) da FMUSP e as etapas seguintes de sequenciamento e análise de dados no Núcleo de Sequenciamento de DNA da Rede PREMiUM FMUSP, localizado no Laboratório de Parasitologia da FMUSP (LIM-46).

##### 4.8.1. Extração do DNA bacteriano

Para extração do DNA bacteriano foi utilizado o *kit* PowerSoil (MoBio Laboratories, USA) (85). Uma alíquota de 1 ml de secreção vaginal previamente estocada a -70 °C foi descongelada, centrifugada a 14.000 rpm por 1 min em microcentrifuga (Eppendorff, Alemanha) e o *pellet* ressuspensão no tubo de lise celular. Foi realizada uma etapa inicial de lise térmica a 65 °C por 10 min, seguida

das etapas de lise mecânica e química e de purificação do DNA, conforme as orientações do fabricante, até a eluição do DNA em 100 µl do tampão de eluição fornecido. O DNA eluído foi quantificado e a pureza verificada por espectrofotometria a 260 e 280 nm, utilizando o equipamento Nanodrop (ThermoFisher, USA). As concentrações obtidas variaram entre 4 e 30 ng/µl.

#### 4.8.2. Amplificação e purificação das sequências-alvo (*amplicons*)

Inicialmente, foram preparadas misturas de *primers*, combinando volumes iguais das soluções-estoque dos *primers* R806 e F515 a 10µM, sendo que, para cada amostra a ser analisada, foi utilizado um *primer* F515 com um *barcode* diferente.

A etapa de amplificação do gene rRNA 16S foi então realizada utilizando-se o *kit* PlatinumR PCR SuperMix High Fidelity (ThermoFisher, USA), de acordo com o quadro abaixo:

#### Quadro 2- Preparação da reação em cadeia de polimerase

Componente	Volume
PlatinumR PCR SuperMix High Fidelity	45 µl
20–50 ng de DNA bacteriano	4 µl
Mistura de <i>primers</i> a 10 µM	1 µl
Total	50 µl

Nas amostras com baixa concentração de DNA foi utilizado o volume máximo para a reação (4 µl), sem prejuízo do rendimento da reação. Em seguida, foi realizada a reação de PCR em termociclador convencional (Applied Biosystems, USA), programado com os seguintes parâmetros:

**Quadro 3- Etapas da reação em cadeia de polimerase**

<b>Estágio</b>	<b>Passo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Único	Ativação da Enzima	94°C	3 min
Ciclos(n=30)	Desnaturação	94°C	30 s
	Anelamento	58°C	30 s
	Extensão	68 °C	1 min
Único		4°C	∞

Seguiu-se então uma etapa de purificação dos *amplicons*, no sentido de remover fragmentos inespecíficos e de baixo peso molecular, os quais poderiam resultar em uma baixa qualidade de sequenciamento. Foi utilizado o reagente Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), seguindo as recomendações do fabricante, em duas etapas. Na primeira etapa, 30 µl do reagente foram adicionados a cada amostra, misturado vigorosamente e incubado a temperatura ambiente por 5 min. A mistura foi então mantida em estante magnética por 2 min, sendo o sobrenadante transferido para um tubo novo e o *pellet* descartado. Foram então adicionados 60 µl do reagente AMPure ao sobrenadante, repetida a incubação e a precipitação em estante magnética e o sobrenadante, dessa vez, descartado. Após 2 etapas de lavagem com Etanol a 70%, o *pellet* foi seco e o DNA eluído em 20 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0), sendo estocado a -20 °C.

A qualidade dos *amplicons* foi verificada pela eletroforese de 4 µl do eluato em gel de agarose a 3%, observando-se uma banda de aproximadamente 350 bp, que corresponde à amplificação da região desejada (**Anexo D**).

### 4.8.3. Preparo das bibliotecas e sequenciamento do DNA

Para o sequenciamento do DNA foi utilizada a plataforma de sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*, NGS) Ion Torrent PGM (ThermoFisher, USA), baseada no uso de chips com tecnologia de semicondutor para detecção da mudança de pH durante o processo de incorporação de nucleotídeos na cadeia de DNA.

Para o preparo das bibliotecas de sequenciamento, inicialmente foi realizada a quantificação dos *amplicons* por fluorimetria com o equipamento Qubit (Invitrogen, USA), sendo utilizado 1  $\mu$ l de cada amostra, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (86). Em seguida, 1  $\mu$ l de cada amostra foi diluído em H<sub>2</sub>O para uma concentração final de 100 pM. Em seguida, 5  $\mu$ l de cada amostra a 100 pM, foram misturados, compondo então um *pool* de amostras equimolares. Dessa forma, foram obtidos *pools* contendo 16 ou 32 amostras identificadas individualmente por um *barcode* específico (*barcodes* 1 a 32) (**Anexo C**).

As etapas seguintes de acoplamento das moléculas de DNA nas esferas de sequenciamento, Ion Spheres ou ISPs (ThermoFisher, USA), amplificação das bibliotecas por PCR em emulsão, enriquecimento das bibliotecas e carregamento dos *chips* de sequenciamento foram conduzidas por protocolo automatizado no equipamento Ion PGM Hi-Q View Chef (ThermoFisher, USA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante para sequências de comprimento  $\geq$  300 bp (87). Uma etapa intermediária de controle de qualidade da amplificação das bibliotecas foi realizada com o *kit* Ion Sphere Quality Control (ThermoFisher, USA). As bibliotecas foram carregadas em pares de *chips* Ion 318 (ThermoFisher, USA), 16 ou 32 amostras por *chip*, sendo um deles inserido imediatamente no equipamento Ion Torrent PGM (ThermoFisher, USA) para sequenciamento e o outro lacrado e estocado a 4 °C por 24 h, até o final da primeira corrida, para então completar a rodada de sequenciamento.

A análise de qualidade do sequenciamento mostrou que houve carregamento satisfatório dos *chips*, tamanho adequado das cadeias sequenciadas, em torno de 292 bp, bem como uma boa profundidade de



sequenciamento, com o número de sequências (*reads*) por amostra variando entre 55.000 e 752.000 (**Anexo F**).

#### **4.8.4. Análise dos dados de sequenciamento**

As sequências de DNA obtidas foram inicialmente processadas com o *pipeline* Ion Torrent Browser (ThermoFisher, USA) para separação entre as amostras individuais e remoção de sequências de adaptadores, *primers*, *barcodes* e sequências pequenas (<50 bp), poli clonais ou de baixa qualidade. A análise bioinformática foi realizada com o *pipeline* Qiime2 (q2) (88, 89). Inicialmente foi checada a qualidade das sequências, para garantir que todas possuíam o escore Phred mínimo de 33, bem como a profundidade do sequenciamento, sendo observada uma média de 232.965 sequências por amostra (mínimo 55.588 - máximo 544.234). Em seguida, as sequências foram truncadas em 240 bp, de acordo com a análise de qualidade, foram removidos o ruído e as sequências quiméricas e geradas variantes de sequências de *amplicons* (ASVs) como o *software* DADA2 (q2-dada2) (90). Foi então construída uma árvore filogenética para análises de diversidade inserindo as sequências na árvore de referência Greengenes 13\_8 pelo método SEPP. (q2- fragment-insertion plugin) (91). Adicionalmente, a análise de rarefação atingiu um platô, demonstrando boa representação da comunidade microbiana. As ASVs foram classificadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com o q2-feature-classifier (92), utilizando como referência o banco de dados Greengenes 13\_8 (93, 94) e considerando uma similaridade mínima de 97%. Ao final, os dados foram sumarizados em uma tabela de abundância relativa dos táxons observados em cada amostra estudada, nos níveis taxonômicos de reino, filo, ordem, classe, família, gênero e espécie.

## 4.9. Análise Estatística

### 4.9.1. Análise Descritiva

Na análise descritiva, as variáveis categóricas foram apresentadas como frequência absoluta e relativa,  $n$  (%). Para a comparação entre os grupos de estudo foi aplicado o teste chi-quadrado ou, quando observadas frequências inferiores a 5%, teste exato de Fisher. As variáveis contínuas foram descritas como média  $\pm$  desvio padrão (valor mínimo - valor máximo), e para a comparação entre os grupos foi aplicado o teste  $t$  de Student, quando houve normalidade, ou alternativamente, o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para os cálculos estatísticos foi usado o programa SPSS v24.0 (IBM, USA). Em todos os casos o nível de significância adotado foi de 95%, ou seja, valores  $p$  inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

### 4.9.2. Análise do conteúdo vaginal por métodos convencionais

Para as comparações entre os 2 tempos de coleta de secreção vaginal ( $T_0$  e  $T_1$ ) foram aplicados o modelo de equações de estimação generalizadas (GEE) por distribuição binomial, com *logit* como função de ligação, para as variáveis categóricas e o modelo *one-way* ANOVA, para as variáveis contínuas (95, 96). Da mesma forma como descrito acima, os cálculos estatísticos foram obtidos com o programa SPSS v24.0 (IBM, USA), adotando nível de significância de 95%.

### 4.9.3. Análise da composição da microbiota vaginal e classificação das amostras em tipos de comunidade (CSTs)

Para a análise da composição da microbiota vaginal nas amostras sequenciadas foram construídos gráficos utilizando as os programas *online* Qiime2 view (<https://view.qiime2.org>) e Microbiome Analyst (97, 98). Para o agrupamento (*clustering*) e classificação das amostras em tipos de composição

(CSTs) foi construído um dendrograma utilizando o algoritmo de ligação completa (*complete linkage*) e a dissimilaridade de Bray-Curtis (99, 100) como métrica de distância entre as amostras, através do programa Microbiome Analyst. Para comparação dos grupos de estudo segundo o tipo de composição foi utilizado o teste de McNemar-Bowker (101), adotando nível de significância de 95%.

#### **4.9.4. Análise da diversidade da microbiota vaginal**

A análise da diversidade individual de cada amostra, ou diversidade alfa, foi realizada com o auxílio do programa Qiime2 (q2-diversity) (89), através da determinação da riqueza (*observed features*) e do índice de Shannon (102) e, para determinação da significância estatística, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, adotando nível de significância de 95%. Adicionalmente, com o objetivo de controlar o viés relacionado à diferença de número de sequências analisadas em cada amostra, a diversidade alfa foi computada pela análise de composição com correção de viés (ANCOM-BC) (103). Para comparação entre grupos foi obtido o valor p pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise da interação entre os 2 grupos de estudo em 2 tempos de coleta foi realizada com o programa R, usando a sintaxe descrita no estudo de Chen et al. (104).

De forma semelhante, a dissimilaridade entre as amostras, ou diversidade beta, foi computada pelo q2-diversity (89), após rarefação em 45.679 sequências por amostra, utilizando as métricas de Jaccard (105), Bray-Curtis (99, 100), UNIFRAC não ponderado e UNIFRAC ponderado (106, 107). Como método de ordenação na matriz de dissimilaridade foi utilizada a PCoA (*Principal Coordinates Analysis*) (108) e para a construção de gráficos foi utilizado o programa *online* EMPeror (109). A determinação da significância estatística dos agrupamentos foi realizada pelo método PERMANOVA pareado (110), também adotando nível de significância de 95%.

Com o objetivo de controlar a ocorrência de erros do tipo I nas análises estatísticas de diversidade alfa e beta foi utilizado o teste *post hoc* de Benjamini-

Hochberg, ou correção pela *false discovery rate* (FDR) (111), com obtenção do valor  $q$ .

#### **4.9.5. Análise de táxons específicos**

Para comparação da abundância de táxons específicos entre os grupos de estudo foi utilizada a ferramenta *online* Microbiome Analyst (97, 98), inicialmente com obtenção da abundância ao nível taxonômico de gênero e espécie em cada uma das amostras. Foi então realizada a análise univariada dos dados de abundância quantitativos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, com valor  $p$  corrigido pela FDR, e nível de significância de 95%.

Adicionalmente, foi realizada a análise de composição (ANCOM) (112) para determinação de táxons com abundância diferencial em relação às variáveis categóricas usando o programa Qiime2 (89), com determinação do valor  $W$  e do resultado do teste de hipótese ( $H_0$ ).

# RESULTADOS

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização da população

#### 5.1.1. História clínica e obstétrica

Como dito anteriormente, foram estudadas 44 gestantes com colo uterino curto ( $\leq 25$  mm) no segundo trimestre, 22 que fizeram uso do pessário de Arabin e 22 da progesterona natural por via vaginal, em 2 tempos de coleta,  $T_0$  – antes do tratamento, e  $T_1$  – depois do tratamento.

Conforme descrito na **Tabela 1**, os grupos de estudo foram semelhantes quanto aos dados demográficos e de história clínica, incluindo as variáveis que pudessem interferir na composição da flora vaginal, como o IMC, o tabagismo e a associação com doenças clínicas, sobretudo aquelas que poderiam cursar com imunossupressão, alterações endócrinas ou uso crônico de antibióticos.

**Tabela 1 - Dados demográficos e história clínica da população em estudo – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018**

Grupo	Pessário (n=22)	Progesterona (n=22)	p
<b>Idade</b>	30 ± 7 (15 - 42)	28 ± 6 (17 - 37)	0,315 <sup>1</sup>
<b>Cor</b>			
<b>Branca</b>	15 (68,2)	16 (72,7)	0,741 <sup>2</sup>
<b>Não branca</b>	7 (31,8)	6 (27,3)	
<b>Nível educacional</b>			
<b>Fundamental completo</b>	2 (9,1)	6 (27,3)	0,293 <sup>3</sup>
<b>Médio completo</b>	13 (59,1)	9 (40,9)	
<b>Superior completo</b>	7 (31,8)	7 (31,8)	
<b>IMC</b>	26,5 ± 4,3 (18,6 - 36,1)	27,7 ± 5,1 (20,5 - 37,7)	0,453 <sup>4</sup>
<b>Tabagismo</b>	1 (4,5)	3 (13,6)	0,294 <sup>2</sup>
<b>Doença associada</b>			
<b>Hipertensão</b>	1 (4,5)	2 (9,1)	1,000 <sup>3</sup>
<b>Trombose/Trombofilia</b>	0 (0,0)	1 (4,5)	1,000 <sup>3</sup>
<b>Diabetes</b>	3 (13,6)	3 (13,6)	1,000 <sup>3</sup>
<b>Hipotireoidismo</b>	2 (9,1)	2 (9,1)	1,000 <sup>3</sup>
<b>Doença auto-imune</b>	2 (9,1)	0 (0,0)	0,488 <sup>3</sup>
<b>Infecção urinária de repetição</b>	1 (4,5)	0 (0,0)	1,000 <sup>3</sup>
<b>Outras</b>	5 (22,7)	4 (18,2)	1,000 <sup>3</sup>

As variáveis categóricas são apresentadas como frequências absoluta e relativa n (%);

As variáveis contínuas são descritas como média ± desvio padrão (valor mínimo - valor máximo)

<sup>1</sup> Teste t de Student

<sup>2</sup> Teste chi-quadrado

<sup>3</sup> Teste exato de Fisher

<sup>4</sup> Teste de Mann-Whitney

Quanto aos antecedentes obstétricos, como mostra a **Tabela 2**, só houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo em relação ao antecedente de parto a termo, sendo mais frequente no grupo Progesterona do que no grupo Pessário.

Para comparação com as taxas de prematuridade observadas, no estudo *Birth in Brazil* (4) a taxa de prematuridade na população geral brasileira foi de 12,1%.

Por outro lado, analisando os antecedentes obstétricos segundo o número de eventos de abortamentos e partos a termo (**Tabela 2**), não houve diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos.

**Tabela 2 - Antecedentes obstétricos da população em estudo – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018**

Grupo	Pessário (n=22)	Progesterona (n=22)	p
<b>Nulíparas</b>	13 (59,1)	8 (36,4)	0,131 <sup>1</sup>
<b>Abortamento</b>	7 (31,8)	8 (36,4)	0,750 <sup>1</sup>
<b>Número de abortamentos</b>	1 (1 - 3)	1 (1 - 2)	0,688 <sup>2</sup>
<b>Parto prematuro &lt; 34 semanas</b>	2 (9,1)	1 (4,5)	1,000 <sup>3</sup>
<b>Parto prematuro 34-37 semanas</b>	2 (9,1)	2 (9,1)	1,000 <sup>3</sup>
<b>Parto a termo</b>	3 (13,6)	9 (40,9)	0,042 <sup>1</sup>
<b>Número de partos a termo</b>	0 (0 - 2)	1 (0 - 3)	0,201 <sup>2</sup>

Variáveis categóricas apresentadas como frequências absoluta e relativa n (%)  
 Variáveis contínuas apresentadas como mediana (mínimo - máximo)

<sup>1</sup> teste chi-quadrado

<sup>2</sup> Teste de Mann-Whitney

<sup>3</sup> Teste exato de Fisher

### 5.1.2. Coleta da secreção vaginal e medida do comprimento do colo uterino

Como mostra a **Tabela 3**, a única variável de coleta com diferença significativa entre os 2 grupos foi a presença de *sludge* cervical, este ocorrendo em 3 casos (13,6%) no grupo Pessário e em 9 casos (40,9%) no grupo Progesterona.



**Tabela 3 - Variáveis associadas à coleta da secreção vaginal e medida do colo uterino em  $T_0$  - HCFMUSP - janeiro 2016 a dezembro 2018**

Grupo	Pessário (n=22)	Progesterona (n=22)	p
IG na coleta (semanas)	22,3 ± 1,1 (20,6 - 23,9)	22,9 ± 0,8 (21,6 - 24,9)	0,107 <sup>1</sup>
Uso prévio de antibióticos	3 (13,6)	0 (0,0)	0,233 <sup>2</sup>
Manipulação prévia	2 (9,1)	2 (9,1)	1,000 <sup>2</sup>
Comprimento do colo (mm)	16,0 ± 6,0 (5,0 - 24,0)	17,0 ± 5,0 (7,0 - 23,0)	0,494 <sup>1</sup>
Presença de <i>sludge</i>	3 (13,6)	9 (40,9)	0,042 <sup>3</sup>

As variáveis categóricas são apresentadas como frequências absoluta e relativa n (%);

As variáveis contínuas são descritas como média ± desvio padrão (valor mínimo - valor máximo)

<sup>1</sup> Teste de Mann-Whitney

<sup>2</sup> Teste exato de Fisher

<sup>3</sup> Teste do chi-quadrado

IG: idade gestacional

### 5.1.3. Desfecho das gestações

Como descrito na **Tabela 4**, a média de IG no parto foi semelhante nos 2 grupos de estudo. Da mesma forma, não houve diferença entre os grupos quanto às outras variáveis de desfecho da gestação.

**Tabela 4 - Desfechos das gestações na população estudada – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018**

Grupo	Pessário (n=22)	Progesterona (n=20) *	p
IG no parto (semanas)	37,4 ± 4,0 (25,4 - 40,3)	37,4 ± 3,4 (25,9 - 40,7)	0,677 <sup>1</sup>
Peso do RN (g)	2748 ± 790 (735 - 4010)	3006 ± 725 (850 - 3820)	0,099 <sup>1</sup>
Via de parto vaginal	14 (63,6)	15 (75,0)	0,426 <sup>2</sup>
Trabalho de parto espontâneo	13 (59,1)	17 (85,0)	0,063 <sup>2</sup>
Parto prematuro espontâneo (<37 sem)	2 (9,1)	6 (30,0)	0,123 <sup>3</sup>
RPMO	2 (9,1)	2 (10,0)	1,000 <sup>3</sup>
Corioamnionite	2 (9,1)	1 (5,0)	1,000 <sup>3</sup>

As variáveis categóricas são apresentadas como frequências absoluta e relativa n (%); as variáveis contínuas são descritas como média ± desvio padrão (valor mínimo-valor máximo)  
 IG, idade gestacional; RN, recém-nascido; RPMO, rotura prematura de membranas ovulares  
 \* 2 gestantes sem informações do parto

<sup>1</sup> Teste de Mann-Whitney

<sup>2</sup> Teste chi-quadrado

<sup>3</sup> Teste exato de Fisher

## 5.2. Caracterização da microbiota vaginal pelas análises convencionais e comparação entre os grupos de estudo

A **Tabela 5** mostra os resultados das análises de rotina realizadas na secreção vaginal. Quanto à bacterioscopia, foi observado que a maioria das gestantes apresentava flora bacteriana normal (escore de Nugent entre 0 e 3), 90,9% ( $T_0$  e  $T_1$ ) no grupo Pessário, 90,9% ( $T_0$ ) e 95,5% ( $T_1$ ) no grupo Progesterona, sem diferença significativa entre os grupos e tempos de coleta. No sentido de facilitar a análise, foram agrupadas numa só categoria, Alterado, as pacientes com escore de Nugent entre 4 e 10, também sem diferença estatística entre os tempos de coleta nos 2 grupos. Do mesmo modo, comparando os resultados do escore de Nugent em valores absolutos (1 a 10),

não foi detectada diferença significativa entre os tempos  $T_0$  e  $T_1$  em nenhum dos grupos.

**Tabela 5 - Bacterioscopia e pesquisa de microorganismos específicos na secreção vaginal – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018**

Grupo	Pessário (n=22)		Progesterona (n=22)		p
	$T_0$	$T_1$	$T_0$	$T_1$	
<b>Escore de Nugent</b>					
Normal (0 - 3)	20 (90,9)	20 (90,9)	20 (90,9)	21 (95,5)	0,570 <sup>1</sup>
Alterado (4 - 10)	2 (9,1)	2 (9,1)	2 (9,1)	1 (4,5)	
Escore mediano	1 (0 - 6)	1 (0 - 7)	1 (0 - 7)	1 (0 - 5)	0,058 <sup>2</sup>
Fungos	7 (20,6)	6 (17,6)	5 (14,7)	5 (16,1)	0,954 <sup>1</sup>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,6)	1 (5,6)	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> <sup>*</sup>		3 (13,6)		2 (10,0)	1,000 <sup>3</sup>

Variáveis categóricas apresentadas como frequência absoluta e relativa n (%)

Variável contínua apresentada como mediana (mínimo - máximo)

$T_0$  coleta antes do tratamento

$T_1$  coleta após o tratamento

<sup>\*</sup> coleta única no terceiro trimestre

<sup>1</sup> Modelo de equações de estimação generalizadas (GEE)

<sup>2</sup> one-way ANOVA

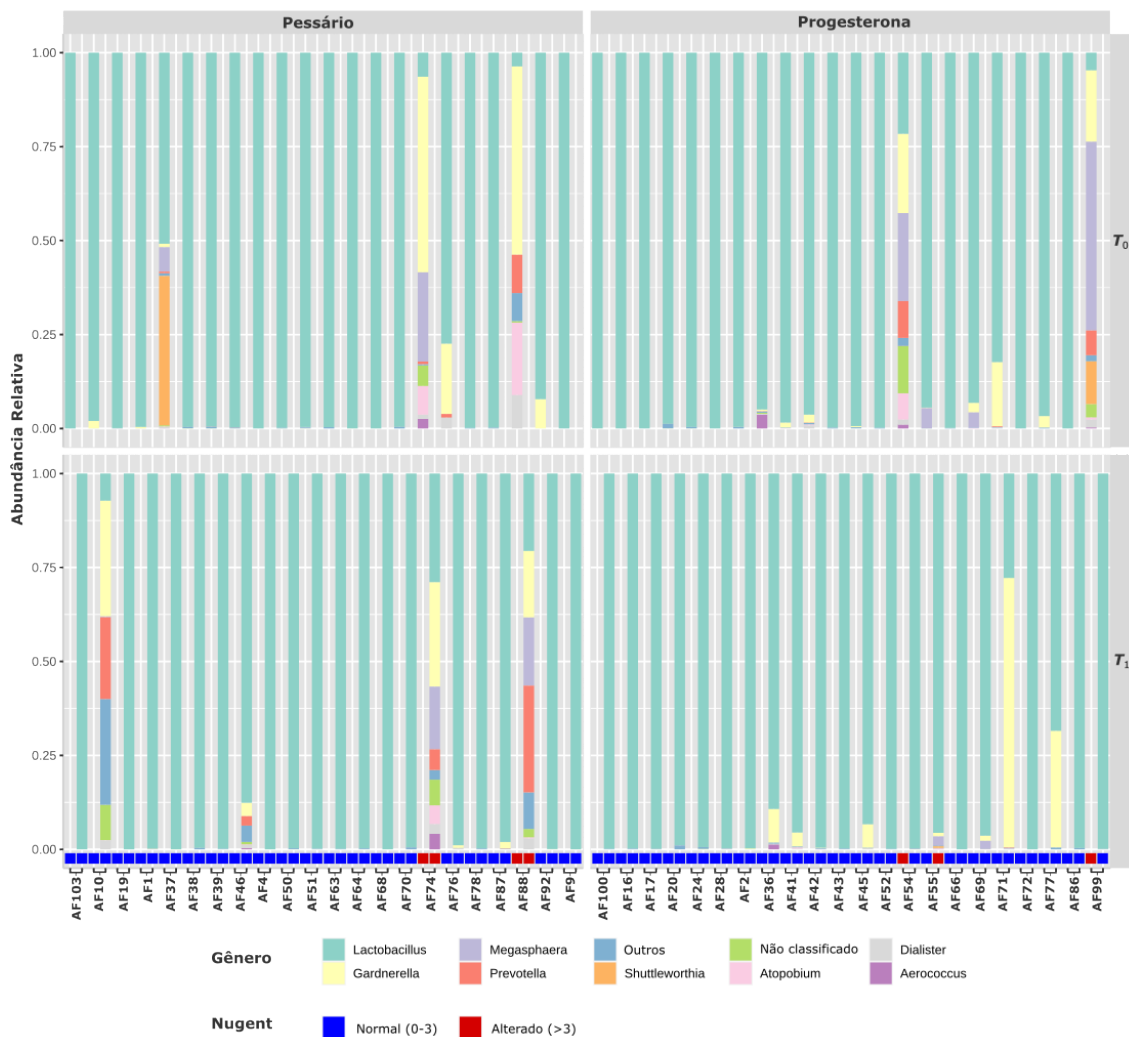
<sup>3</sup> Teste exato de Fisher

Com relação à pesquisa de micro-organismos específicos, não foi observada diferença quanto à presença de fungos no exame a fresco entre os 2 grupos de estudo, nos 2 tempos de coleta, bem como quanto à presença de *S.agalactiae* no terceiro trimestre (**Tabela 5**). Por fim, na população estudada não houve detecção de *Trichomonas vaginalis* ou de *Neisseria gonorrhoeae* em nenhuma coleta e a pesquisa de *C.trachomatis* só foi positiva em uma gestante, impossibilitando a análise referencial.

### 5.3. Caracterização da microbiota vaginal pelo sequenciamento 16S e comparação entre os grupos de estudo

#### 5.3.1. Composição e estabilidade da microbiota vaginal

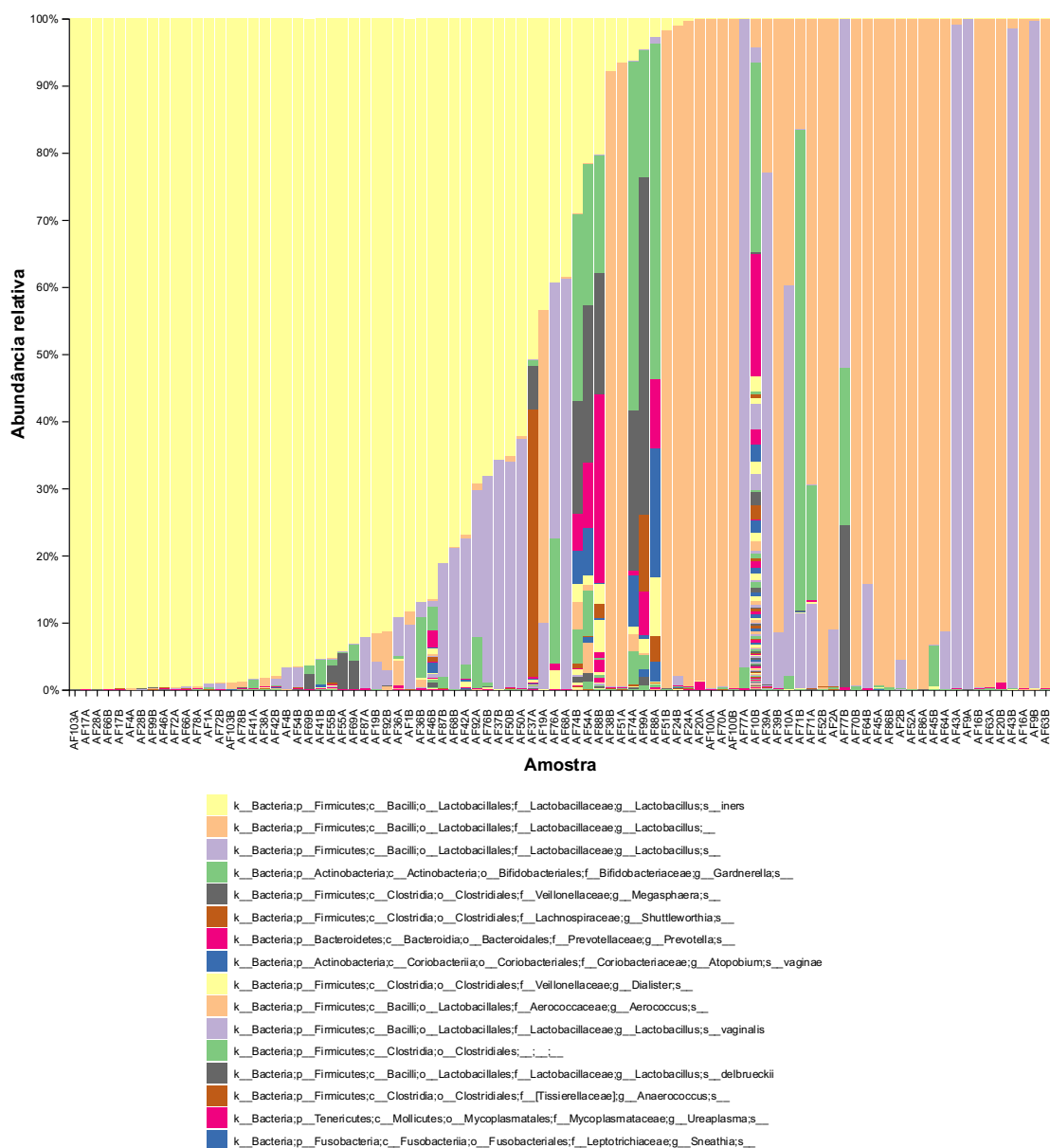
A **Figura 1** mostra a representação gráfica da abundância relativa dos gêneros de bactérias detectados nas 88 amostras analisadas, sendo observada, como esperado, dominância de *Lactobacillus* na maioria delas. Por outro lado, nas amostras AF37, AF74 e AF88 (em  $T_0$ ) e AF10, AF74 e AF88 ( $T_1$ ), do grupo Pessário, bem como nas amostras AF54 e AF99 ( $T_0$ ) e AF71 ( $T_1$ ), do grupo Progesterona, foi observada uma composição mista, sem dominância de *Lactobacillus* e incluindo anaeróbios. Adicionalmente, na maioria das amostras houve correlação entre a composição da microbiota e o escore de Nugent, exceto nas amostras AF37 ( $T_0$ ), AF10, AF55 e AF71 ( $T_1$ ). De forma semelhante, na maioria dos casos a microbiota apresentou-se estável entre os 2 tempos de coleta. Ao contrário, nas amostras AF10 (grupo Pessário) e AF71 (grupo Progesterona) houve transição de uma composição com dominância de *Lactobacillus* para uma composição com maior diversidade e presença de anaeróbios, e nas amostras AF37 (grupo Pessário), AF54 e AF99 (grupo Progesterona) houve modificação da microbiota no sentido oposto (**Figura 1**).



**Figura 1 - Composição da microbiota vaginal nos grupos Pessário e Progesterona.**

*Abundância relativa dos principais gêneros presentes na microbiota das amostras estudadas e correlação com o escore de Nugent observado. Painéis esquerdos: grupo Pessário; painéis direitos: grupo Progesterona; painéis superiores: tempo de coleta  $T_0$ ; painéis inferiores: tempo de coleta  $T_1$ .*

O sequenciamento da região V4 do gene rRNA 16S, como realizado no presente estudo, permite a classificação taxonômica acurada até o nível de gênero. Para uma classificação mais abrangente, ao nível de espécie, seria necessário o sequenciamento de múltiplas regiões hipervariáveis do 16S. Em vista disso, não foi inicialmente possível agrupar as amostras de secreção vaginal nos tipos fundamentais, as CSTs I, II, III e V, com dominância de *L.crispatus*, *L.gasseri*, *L.iners* e *L.jenseni*, respectivamente, e a CST-IV, caracterizada pela ausência de dominância de *Lactobacillus* e presença de microbiota diversificada, incluindo bactérias estritamente anaeróbias associadas à VB, como a *Gardnerella*. No entanto, mesmo sem a distinção entre todas as espécies de *Lactobacillus* foi possível a identificação de *L. iners*, bem como a determinação de sua abundância relativa, como mostra a **Figura 2**, onde pode ser notada a dominância de *L. iners* em grande parte das amostras.



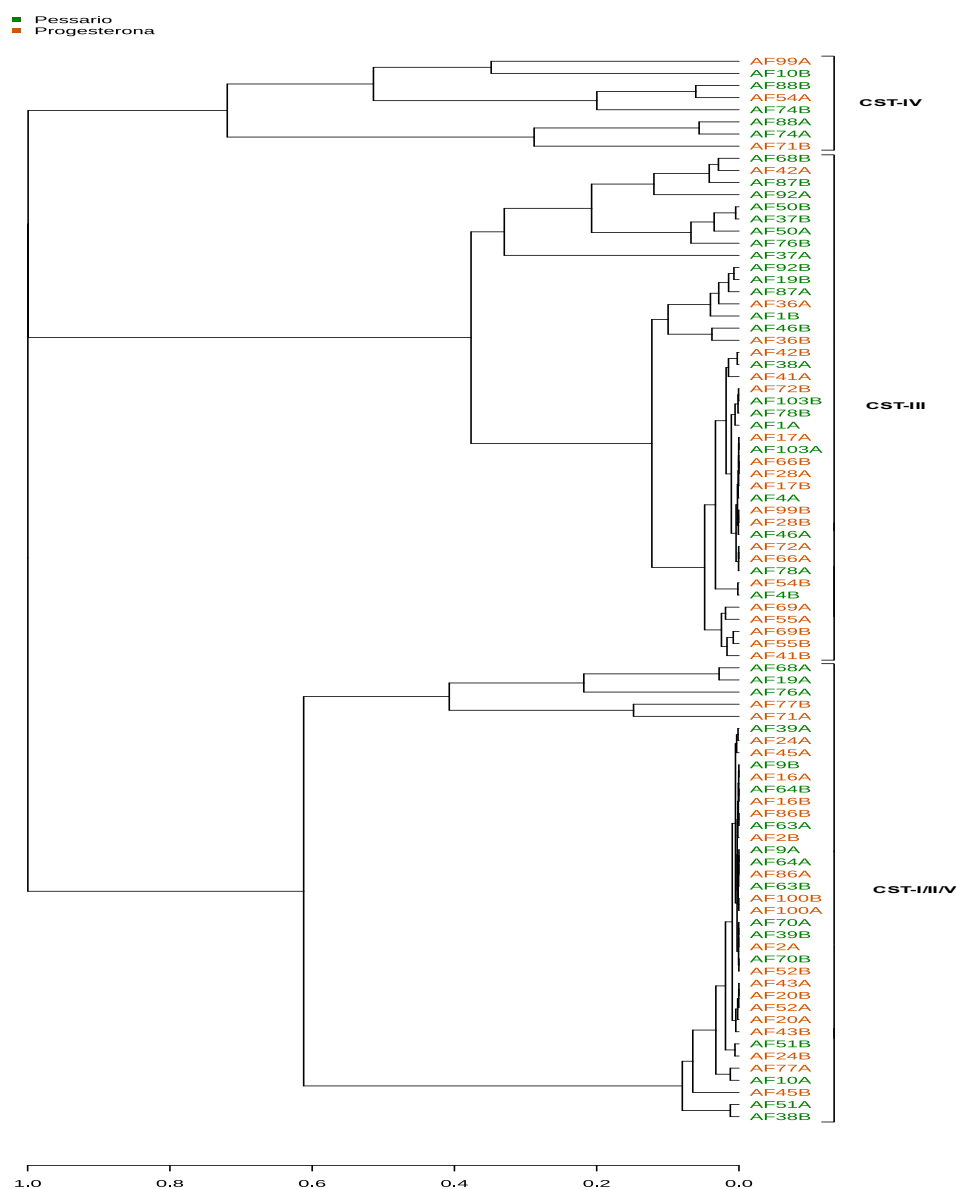
**Figura 2 - Dominância de *Lactobacillus* na microbiota vaginal**

*Abundância relativa dos táxons identificados na microbiota vaginal, após reclassificação até o nível de espécies. As amostras foram ordenadas na ordem decrescente da abundância relativa de *Lactobacillus iners*, que é o táxon dominante em aproximadamente metade das amostras. Pannel inferior: legenda para os táxons observados.*

### 5.3.2. Classificação das amostras em tipos de comunidade (CSTs)

Utilizando a classificação taxonômica ao nível de espécies e aplicando uma série de algoritmos e métricas de dissimilaridade, foi possível observar agrupamentos, ou *clusters*, de amostras segundo a semelhança da composição. A métrica que melhor distinguiu entre os tipos fundamentais de composição (CSTs) nas amostras estudadas foi a dissimilaridade de Bray-Curtis, melhor detalhada adiante. Dessa forma, como demonstrado no dendrograma da **Figura 3**, foi possível classificar as amostras em 3 tipos de composição: CST-I/II/IV, englobando as comunidades com dominância de *Lactobacillus* não-*iners*; CST-III, com dominância de *L.iners*; e CST-IV, sem dominância de *Lactobacillus*.





**Figura 3 - Classificação da microbiota vaginal em tipos de comunidades (CSTs)**

*Dendrograma das 88 amostras analisadas, construído com o algoritmo de ligação completa (complete linkage) e utilizando a dissimilaridade de Bray-Curtis como métrica de distância entre as comunidades. É possível distinguir 3 agrupamentos (CSTs), conforme indicado à direita. No canto superior esquerdo: Legenda para os grupos de estudo.*

Com o objetivo de verificar se ocorreram mudanças na composição da microbiota vaginal entre os 2 tempos de coleta, particularmente no sentido de

composições associadas à disbiose, foi realizada uma comparação das CSTs nesses 2 tempos, conforme mostrado na **Figura 4**. Embora tenham ocorrido mudanças na composição da microbiota vaginal após o início do tratamento em alguns casos, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os 2 tempos de coleta, em ambos os grupos de estudo. Portanto, é possível concluir que, na população estudada, a microbiota vaginal se manteve estável após o tratamento com pessário ou progesterona.

		Pessário (p=0,368) *			Total	Progesterona (p=0,223) *			Total
		$T_0$				$T_0$			
		I/II/IV	III	IV		I/II/IV	III	IV	
$T_1$	I/II/IV	6	1	0	7	10	0	0	10
	III	3	9	0	12	0	9	2	11
	IV	1	0	2	3	1	0	0	1
Total		10	10	2	22	11	9	2	22

\* Teste de McNemar-Bowker

#### Figura 4 - Estabilidade da composição da microbiota vaginal

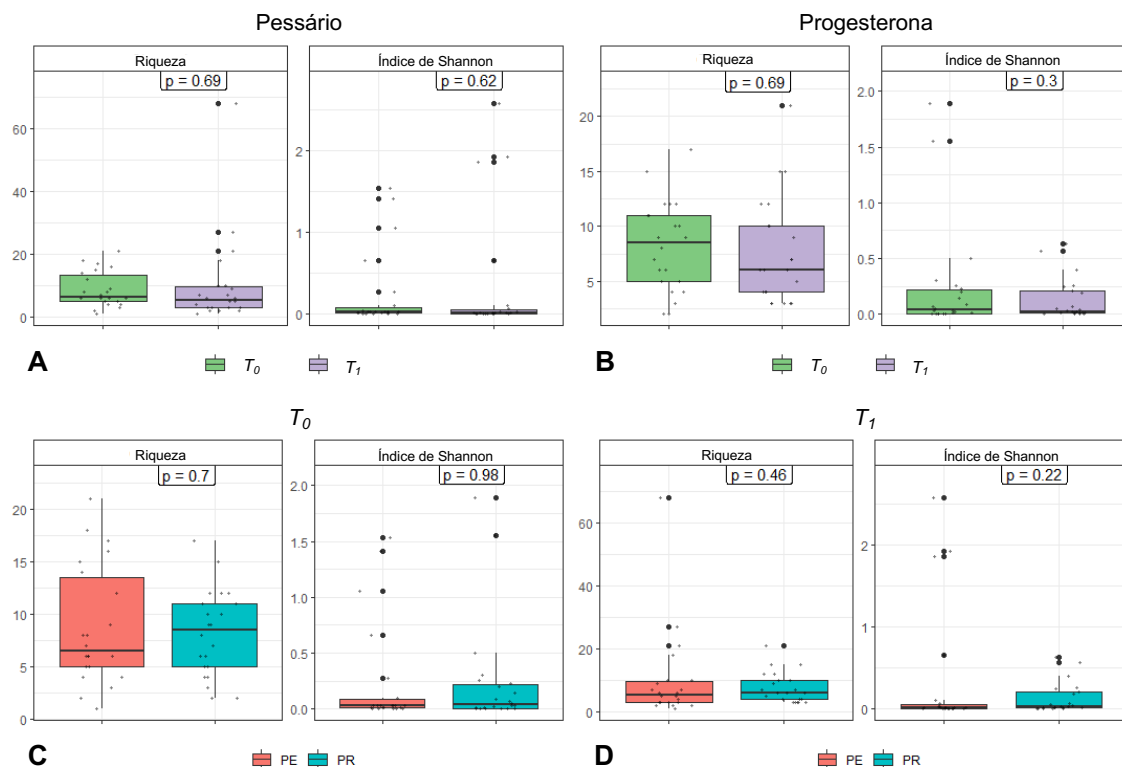
Matriz de distribuição do número de amostras classificadas nas CSTs I/II/IV, III e IV, respectivamente, nos grupos de estudo Pessário e Progesterona e nos tempos de coleta  $T_0$  e  $T_1$ . Nas cores verde (grupo Pessário) e laranja (grupo Progesterona) está destacado o número de amostras que permaneceram na mesma CST entre os 2 tempos de coleta.

#### 5.3.3. Diversidade intra-amostra da microbiota vaginal (Diversidade Alfa)

A diversidade de um ecossistema tem 2 componentes, a riqueza e a uniformidade. A riqueza expressa unicamente o número de espécies diferentes presentes no ecossistema, sendo que quanto maior esse número, maior a

diversidade. Por outro lado, a uniformidade refere-se à distribuição relativa do número de indivíduos de cada espécie, quanto maior a uniformidade, maior a diversidade. Dessa forma, em ecossistemas onde haja dominância numérica de um determinado táxon, como é o caso da microbiota vaginal, onde há predominância de *Lactobacillus*, a uniformidade é menor e, portanto, a diversidade é menor (102). Por exemplo, considerando a composição da microbiota na **Figura 1**, comparando a amostra AF10 nos tempos  $T_0$  e  $T_1$ , pode-se dizer que, no tempo  $T_1$ , tanto o número de táxons presentes (riqueza) quanto a uniformidade da contribuição desses táxons para composição aumentaram e, conseqüentemente, aumentou a diversidade.

Nesse sentido, há uma série de métricas descritas para a análise da diversidade alfa, cada qual atribuindo um peso maior ou menor aos 2 componentes da diversidade, conforme o tipo de inferência desejado. Dessa forma, utilizando a metodologia de ANCOM-BC, a diversidade alfa das amostras estudadas foi descrita em termos da riqueza de táxons observados (*observed features*) e pela determinação do índice de Shannon, o qual leva em consideração tanto a riqueza quanto a uniformidade da composição (**Figura 5**).



**Figura 5 - Diversidade alfa ao nível de gênero da microbiota vaginal na população de estudo.**

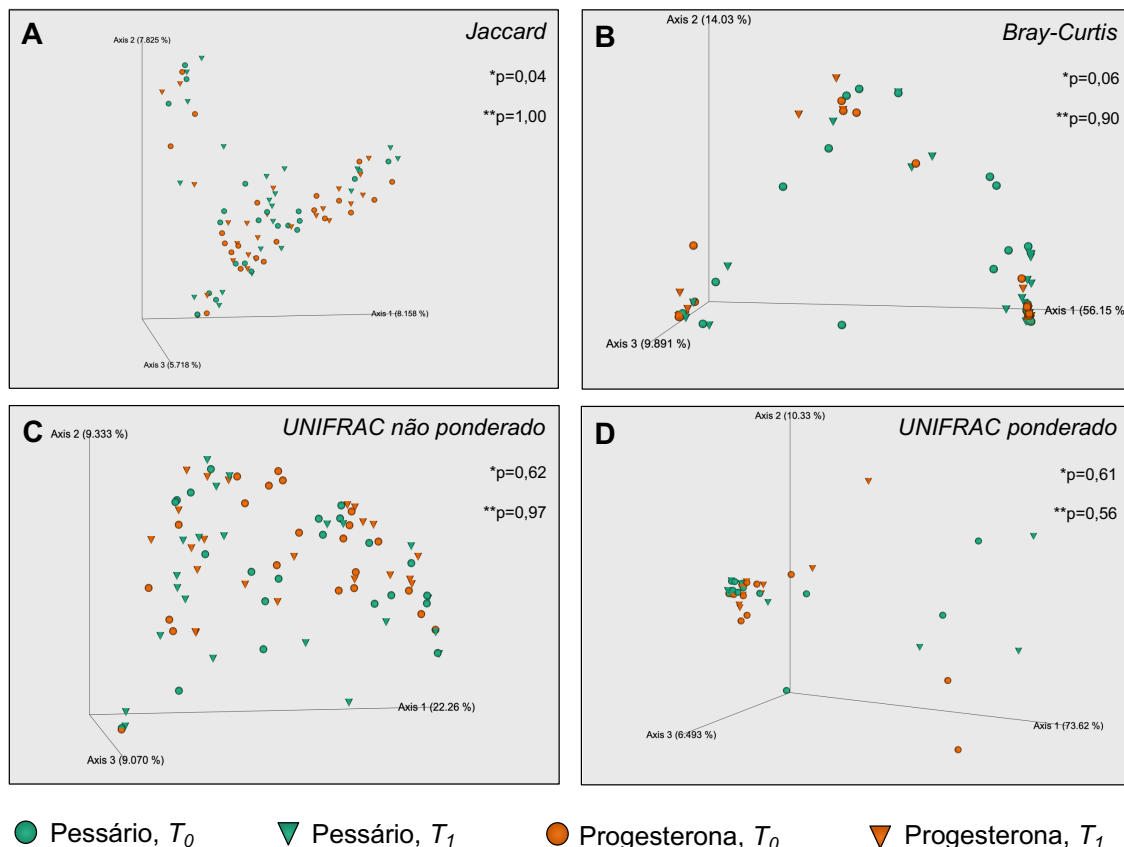
*ANCOM-BC* comparando a diversidade alfa pelas métricas de riqueza e índice de Shannon nos diferentes grupos de estudo. **A** e **B**: comparação entre os tempos de coleta  $T_0$  (cor verde) e  $T_1$  (cor violeta) nos grupos Pessário (**A**) e Progesterona (**B**); **C** e **D**: comparação entre os grupos Pessário (cor vermelha) e Progesterona (cor azul) nos tempos de coleta  $T_0$  (**C**) e  $T_1$  (**D**). PE: grupo Pessário; PR: grupo Progesterona; nas caixas em destaque o valor  $p$  pelo teste de Kruskal-Wallis.

Embora tenha sido observada maior riqueza no tempo  $T_0$  do grupo Progesterona (**Figura 5, B e C**), a comparação com o grupo Pessário não foi estatisticamente significativa. De maneira semelhante, comparando os 2 tempos de coleta dentro de cada grupo de estudo (**Figura 5, A e B**), bem como os 2 grupos de estudo em cada tempo de coleta (**Figura 5, C e D**), não foi observada diferença significativa na diversidade alfa entre os grupos, ou seja, o tratamento não teve influência sobre a diversidade alfa da microbiota vaginal

#### 5.3.4. Diversidade da microbiota entre as amostras estudadas (Diversidade Beta)

A diversidade beta é conceituada como a dissimilaridade da composição da microbiota entre 2 comunidades separadas espacialmente, temporalmente ou por algum outro fator experimental. Como descrito anteriormente para a diversidade alfa, a diversidade beta pode ser calculada por diferentes métricas, de acordo com a interpretação pretendida. De maneira geral, essas métricas podem ser classificadas em qualitativas, onde apenas a presença ou ausência de determinado táxon é levada em consideração, e quantitativas, onde também é considerada a abundância relativa de cada táxon. Pode-se dizer que métricas qualitativas são mais adequadas quando a intenção é analisar a presença de táxons raros, enquanto as métricas quantitativas são adequadas à comparação de comunidades com predominância de determinados táxons, como, por exemplo, no caso da microbiota vaginal. Adicionalmente, existem métricas que incorporam a distância filogenética entre os táxons observados na análise da dissimilaridade e são consideradas mais robustas para a análise de sequências de 16S por incorporar o grau de divergência dessas sequências na análise. Do ponto de vista matemático, diferentemente da diversidade alfa, onde a cada amostra é atribuído um índice numérico, a diversidade beta é computada como uma matriz contendo a distância, ou dissimilaridade, entre cada amostra individual e as outras que compõem a análise. Consequentemente, para facilitar a visualização dos dados é necessária a ordenação dos dados em um espaço multidimensional.

Dessa forma, a diversidade beta das amostras estudadas foi descrita pelas métricas de Jaccard (qualitativa, sem distância filogenética), Bray-Curtis (quantitativa, sem distância filogenética), UNIFRAC não ponderado (qualitativa, com distância filogenética) e UNIFRAC ponderado (quantitativa, com distância filogenética), como mostra a **Figura 6**.



**Figura 6 - Diversidade beta ao nível de gênero da microbiota vaginal na população de estudo.**

Gráficos de PCoA da diversidade beta, segundo diferentes métricas. **A:** Jaccard; **B:** Bray-Curtis; **C:** UNIFRAC não ponderado; **D:** UNIFRAC ponderado. Nos cantos superiores direitos o valor de  $p$  das comparações entre grupos Pessário e Progesterona (\*), e entre os tempos  $T_0$  e  $T_1$  (\*\*), pelo teste PERMANOVA pareado. Não houve mudança na significância estatística após correção do valor  $p$ . Na linha inferior, legenda para os parâmetros experimentais. Cor verde: grupo Pessário; Cor laranja: grupo Progesterona; Esferas: tempo de coleta  $T_0$ ; Cones: tempo de coleta  $T_1$ .

Considerando as diferentes métricas aplicadas, pode-se observar que, nas métricas qualitativas (**Figura 6, A e C**) a variação em cada eixo da ordenação foi pequena, atingindo o valor de 7,8% no eixo 2 de Jaccard (**Figura 6, A**) e 22,3% no eixo 1 de UNIFRAC não ponderado (**Figura 6, C**), o que possivelmente reflete a baixa riqueza da microbiota vaginal. Ao contrário, a variação pelas métricas quantitativas foi maior, 56,1% e 73,6% no eixo 1 de Bray-Curtis e UNIFRAC ponderado, respectivamente (**Figura 6, B e D**). Nesse último

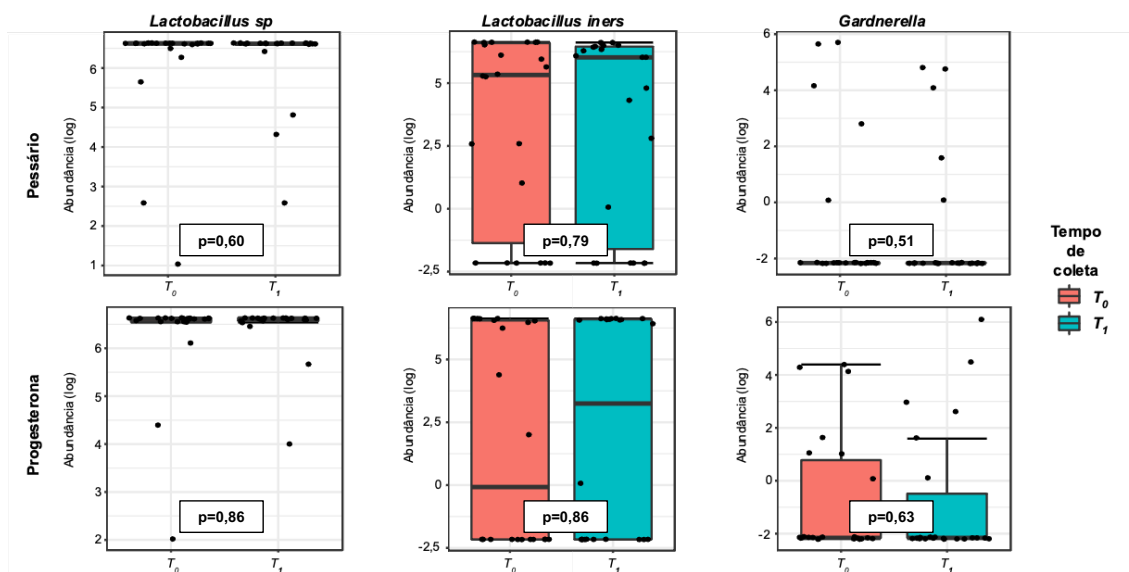
caso, é interessante observar que a maioria das amostras formou um agrupamento devido à grande abundância de *Lactobacillus*. As amostras restantes, que se distanciaram desse agrupamento, correspondem àquelas com composição mais variada, sem dominância de *Lactobacillus* (**Figura 6, D**).

Observando ainda a **Figura 6**, visualmente não foram identificados agrupamentos claros de amostras pertencentes a um grupo experimental específico, sejam os grupos de estudo ou os tempos de coleta. Entretanto, na análise estatística foi observada diferença significativa entre os grupos Pessário e Progesterona quanto à diversidade beta pela métrica de Jaccard (**Figura 6, A**), o que pode ser interpretado como presença ou ausência de táxons minoritários entre esses grupos, uma vez que essa métrica é puramente qualitativa. A presença ou ausência de táxons minoritários, ainda que confirmem algum grau de dissimilaridade entre amostras, podem não ser relevantes no caso da microbiota vaginal, onde há grande predomínio de *Lactobacillus*. Por outro lado, como já dito anteriormente, a métrica de Bray-Curtis foi a que melhor separou os agrupamentos correspondentes às CSTs fundamentais (**Figura 6, B**). Considerando todos esses resultados, pode-se concluir que não foi observada diferença significativa da diversidade beta entre os grupos de estudo ou os tempos de coleta, ou seja, o uso do pessário ou da progesterona não parece estar associado à dissimilaridade das amostras estudadas (**Figura 6**).

### 5.3.5. Correlação entre a abundância de táxons específicos e os grupos de estudo

Como já descrito anteriormente, a microbiota das amostras estudadas apresentou grande predominância de *Lactobacillus*, notadamente *L.iners*, sendo também observada predominância de *Gardnerella* em algumas amostras. Foi então realizada uma comparação dos grupos de estudo por análise univariada em relação à abundância desses 3 táxons, conforme mostrado na **Figura 7**. É possível observar que o *L.iners* foi mais prevalente no grupo Pessário e, ao contrário, a *Gardnerella* foi mais prevalente no grupo Progesterona. De forma semelhante, comparando os tempos de coleta  $T_0$  e  $T_1$ , houve aumento de *L.iners*

no tempo  $T_1$  em ambos os grupos e diminuição de *Gardnerella* no tempo  $T_1$  no grupo Progesterona. No entanto, do ponto de vista estatístico, não foi observada diferença significativa na abundância desses táxons entre os tempos de coleta  $T_0$  e  $T_1$  em ambos os grupos de estudo (**Figura 7**). Portanto, o tratamento para o colo curto não foi associado a uma mudança significativa no conteúdo dos táxons mais relevantes presentes na microbiota vaginal.



**Figura 7 - Comparação da abundância dos táxons majoritários entre os tempos de coleta  $T_0$  e  $T_1$  nos grupos Pessário e Progesterona**

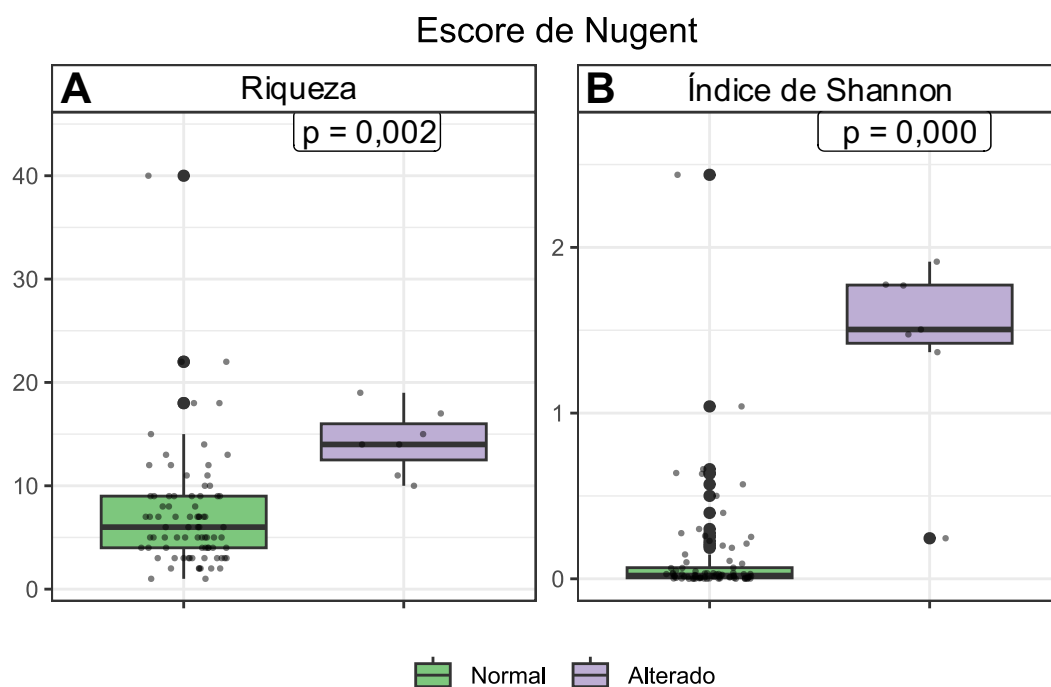
*Análise univariada comparando a abundância de Lactobacillus sp (painéis esquerdos), L.iners (painéis centrais) e Gardnerella (painéis direitos) entre os tempos de coleta  $T_0$  (cor vermelha) e  $T_1$  (cor azul) nos grupos Pessário (painéis superiores) e Progesterona (painéis inferiores). Nas caixas em destaque o valor  $p$  pelo teste de Mann-Whitney.*

Foi também realizada uma análise de composição (ANCOM), porém não foram identificados táxons com abundância diferencial entre os grupos de estudo, Pessário e Progesterona, bem como entre os tempos de coleta  $T_0$  e  $T_1$ .



#### 5.4. Correlação entre a microbiota vaginal e o escore de Nugent

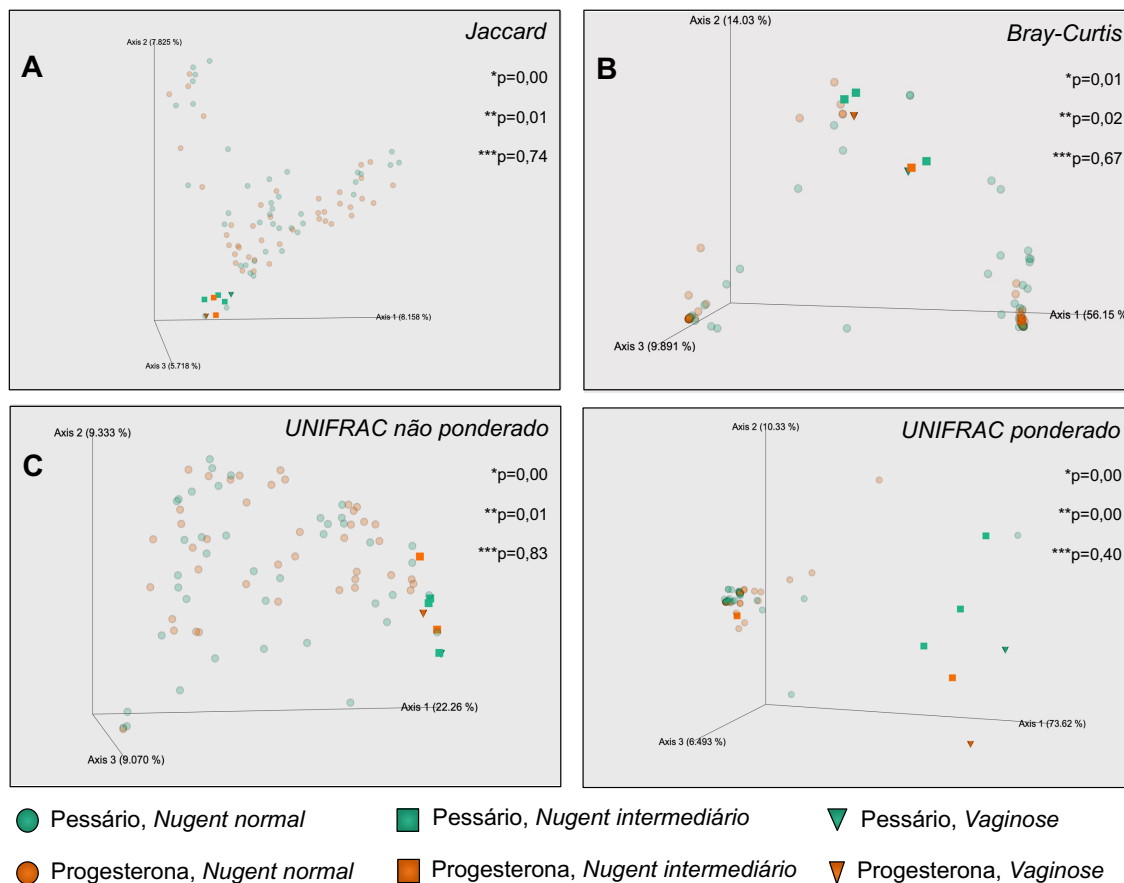
De maneira semelhante ao realizado na comparação entre os grupos de estudo, a diversidade alfa das amostras estudadas foi analisada em relação à respectiva categoria do escore de Nugent, reclassificadas em Normal (0-3) e Alterado (>3). Dessa forma, foi observado que a categoria Alterado está associada à maior diversidade alfa da composição, com diferença significativa em relação à categoria Normal (**Figura 8**).



**Figura 8 - Correlação entre a diversidade alfa ao nível de gênero da microbiota vaginal e as categorias do escore de Nugent.**

*Análise por ANCOM-BC da diversidade alfa ao nível de gênero em relação ao escore de Nugent. A: diversidade alfa descrita pela riqueza de táxons observados; B: diversidade alfa descrita pelo Índice de Shannon. Em destaque, os valores p da comparação pelo teste de Kruskal-Wallis; Cor verde: escore de Nugent normal (0-3); Cor violeta: escore de Nugent alterado (>3).*

Adicionalmente, foi analisada a correlação da diversidade beta com as categorias do escore de Nugent (**Figura 9**).



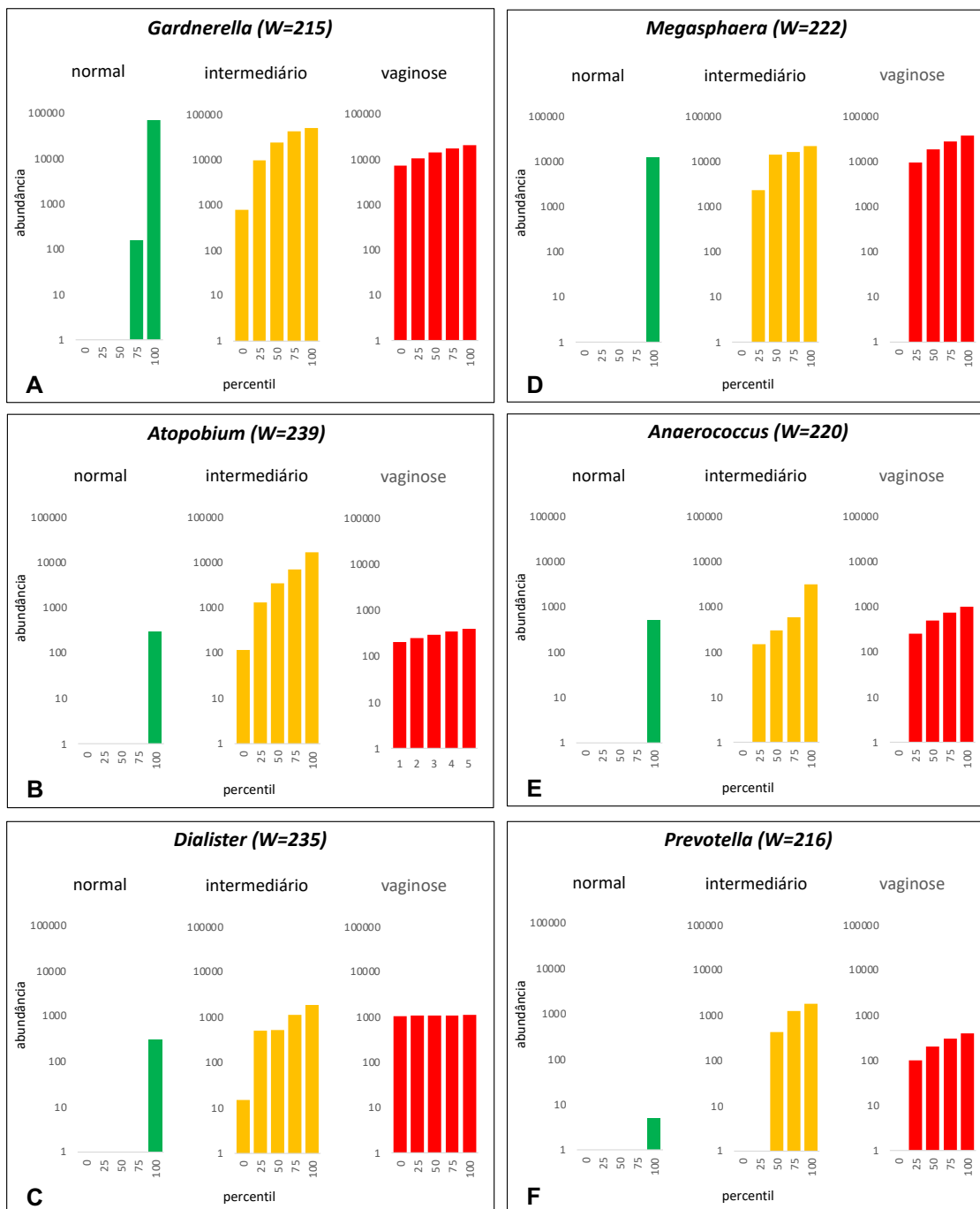
**Figura 9 - Correlação entre a diversidade beta ao nível de gênero da microbiota vaginal e as categorias do escore de Nugent.**

Gráficos de PCoA da diversidade beta, segundo diferentes métricas. **A:** Jaccard; **B:** Bray-Curtis; **C:** UNIFRAC não ponderado; **D:** UNIFRAC ponderado. Nos cantos superiores direitos o valor de  $p$  das comparações entre as categorias Normal e Intermediário (\*), Normal e VB (\*\*), e Intermediário e VB (\*\*\*), pelo teste PERMANOVA pareado. Não houve mudança na significância estatística após correção post hoc. Na linha inferior, legenda para os parâmetros experimentais. Cor verde: grupo Pessário; Cor laranja: grupo Progesterona; Esferas: tempo de coleta escore de Nugent normal; Quadrados: escore de Nugent intermediário; Cones: vaginose bacteriana. A opacidade das amostras com escore normal foi reduzida para facilitar a visualização dos agrupamentos com escore alterado.

Em todas as métricas utilizadas ocorreram agrupamentos de amostras com escore alterado ( $>3$ ), sendo que houve diferença significativa entre a categoria Normal e as categorias Intermediário e VB, mas não entre as categorias Intermediário e Normal.

Por fim, utilizando a análise de composição (ANCOM), foi observada abundância diferencial de alguns táxons sabidamente associados à VB, como a *Gardnerella*, em relação às categorias do escore de Nugent. Nessa análise a abundância foi plotada como uma distribuição em percentis, onde os percentis 0 e 100 correspondem respectivamente aos valores mínimo e máximo observados e o percentil 50 ao valor médio. Além disso, foi computado o valor W, o qual se correlaciona com a significância do teste de hipóteses. Valores W acima de 100 geralmente são considerados significantes. Dessa forma, foi demonstrado um aumento significativo de 6 gêneros nas categorias Intermediário e VB: *Gardnerella*, *Atopobium*, *Dialister*, *Megasphaera*, *Anaerococcus* e *Prevotella* (**Figura 10**).

Considerando todas as análises realizadas, foi possível afirmar que, como esperado, o escore de Nugent elevado nas amostras estudadas correspondeu a composições da microbiota vaginal com maior diversidade e presença de táxons previamente associados à VB.



**Figura 10 - Abundância diferencial em relação às categorias do escore de Nugent**

ANCOM mostrando a abundância dos 6 gêneros com abundância diferencial entre as categorias do escore de Nugent. Entre parênteses, ao lado de cada táxon, o valor W correspondente. Eixo vertical: abundância (log); Eixo horizontal: percentis de distribuição da abundância; Cor verde: Nugent normal; Cor laranja: Nugent intermediário; Cor vermelha: VB.

## 5.5. Correlação entre a disbiose da secreção vaginal e o desfecho da gestação

### 5.5.1. Descrição dos casos com parto prematuro na população estudada

Um dos objetivos secundários do presente estudo foi correlacionar possíveis alterações da microbiota vaginal ao desfecho da gestação e, dentre as 44 gestantes estudadas houve 8 partos espontâneos com idade gestacional abaixo de 37 semanas, 2 no grupo Pessário e 6 no grupo Progesterona, conforme mostra a **Tabela 6**.

**Tabela 6 - Características das gestantes que evoluíram para parto espontâneo com idade gestacional abaixo de 37 semanas – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018**

Amostra	Grupo	IG parto	Colo uterino (mm)	Sludge	RPMO	Corioamnionite	CST $T_0$	CST $T_1$
AF10	PE	25,4	9,0	-	-	+	I/II/V	IV
AF9	PE	25,6	10,0	-	+	-	I/II/V	I/II/V
AF43	PR	25,9	14,0	+	+	-	I/II/V	I/II/V
AF100	PR	32,1	12,0	+	-	-	I/II/V	I/II/V
AF36	PR	35,3	7,0	+	-	-	III	III
AF72	PR	35,4	20,5	-	-	-	III	III
AF54	PR	36,4	12,0	-	-	-	IV	III
AF16	PR	36,9	22,5	-	-	-	I/II/V	I/II/V

PE: Pessário; PR: Progesterona; IG: idade gestacional; RPMO: rotura prematura de membranas ovulares

Nesse grupo, houve 2 casos de mudança no tipo de composição da microbiota vaginal, indicando uma possível instabilidade da composição. Dessa forma, em um dos casos (AF10) do grupo Pessário, a gestante evoluiu para um parto prematuro extremo, associado a corioamnionite. Curiosamente, essa paciente apresentou mudança na composição da microbiota vaginal após a inserção do pessário, de uma composição normal (CST-I/II/V) para uma composição possivelmente disbiótica (CST-IV). Por outro lado, na paciente AF54, grupo Progesterona, foi observada mudança de uma composição disbiótica para uma composição com dominância de *L.iners*. Nos demais casos,

a microbiota vaginal permaneceu estável e com composições ricas em *Lactobacillus* (**Tabela 6**).

### 5.5.2. Correlação entre a diversidade da microbiota vaginal e o desfecho da gestação

Foi realizada a análise da diversidade alfa e beta das amostras estudadas, através das mesmas métricas utilizadas anteriormente na comparação entre os grupos de estudo, em relação ao desfecho da gestação. Dessa forma, como mostra a **Tabela 7**, após correção do valor p pelo teste de Benjamini-Hochberg, não foram demonstradas associações significantes entre a diversidade alfa e nenhum dos desfechos analisados, bem como com a presença do *sludge* cervical.

**Tabela 7 - Correlação entre a diversidade da microbiota vaginal e o desfecho da gestação – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018**

Desfecho	Diversidade Alfa ( p )*		Diversidade Beta ( p )**			
	Riqueza	Índice de Shannon	Jaccard	Bray-Curtis	UNIFRAC não ponderado	UNIFRAC ponderado
<b>PPT &lt; 37 sem</b>	0,888	0,128	0,003	0,017 <sup>1</sup>	0,040 <sup>2</sup>	0,476
<b>PPT &lt; 34 sem</b>	0,754	0,939	0,002	0,002	0,166	0,270
<b>RPMO</b>	0,259	0,170	0,052 <sup>3</sup>	0,026 <sup>4</sup>	0,771	0,573
<b>Corioamnionite</b>	0,944	0,366	0,252	0,340	0,088	0,680
<b>Sludge</b>	0,776	0,788	0,019 <sup>5</sup>	0,479	0,656	0,632

\* Teste de Kruskal-Wallis pareado; \*\* PERMANOVA pareado;

PPT: parto prematuro; RPMO: rotura prematura de membranas ovulares

Teste de Benjamini-Hochberg:

<sup>1</sup> valor q=0,050

<sup>2</sup> valor q=0,120

<sup>3</sup> valor q=0,068

<sup>4</sup> valor q=0,078

<sup>5</sup> valor q=0,019

Com relação à diversidade beta, foram demonstradas associações significantes com a ocorrência do parto prematuro, tanto abaixo de 37 como

abaixo de 34 semanas de gestação, pelas métricas de Jaccard (qualitativa) e Bray-Curtis (quantitativa), o que pode ser explicado tanto pela presença de táxons minoritários como pela diminuição da dominância de *Lactobacillus* nas amostras de gestantes com parto prematuro. Por outro lado, esse resultado não foi confirmado pelas métricas baseadas em distância filogenética, (UNIFRAC). De maneira semelhante, foi observada uma associação significativa entre a diversidade beta e a presença de *sludge* cervical por Jaccard, porém não confirmada em métricas quantitativas (**Tabela 7**).

### 5.5.3. Correlação entre a abundância de táxons específicos e o desfecho da gestação

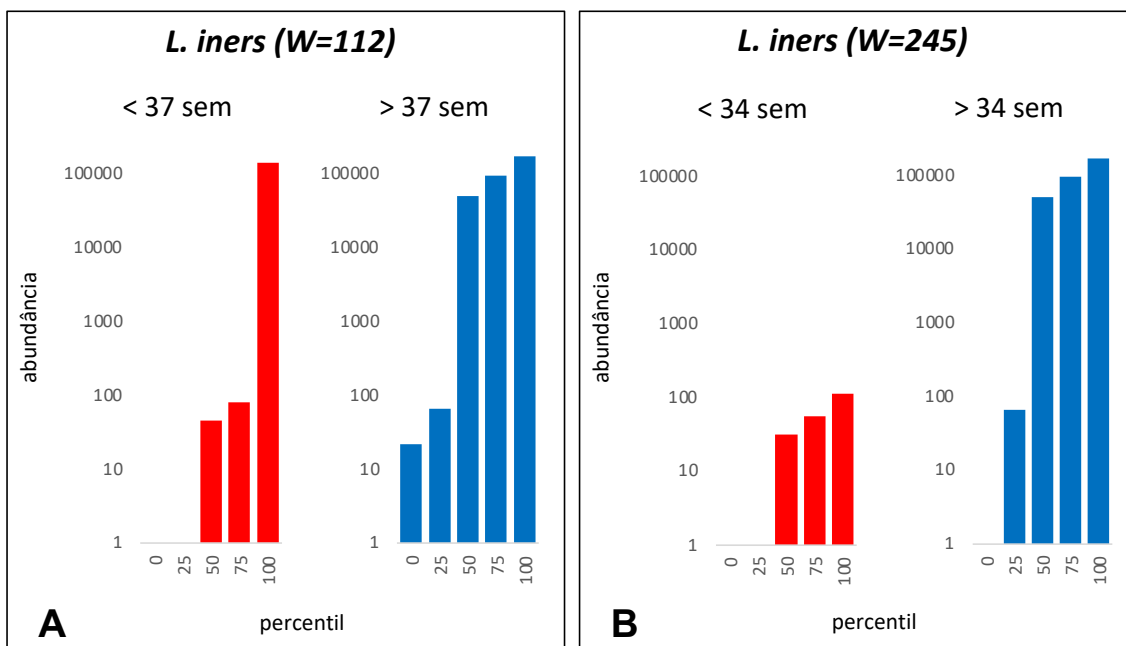
Do mesmo modo como descrito anteriormente para os grupos de estudo, não foi demonstrada associação significativa entre os táxons majoritários na população estudada e o desfecho da gestação, bem como com a presença de *sludge* cervical pela análise univariada (**Tabela 8**).

**Tabela 8 - Comparação entre a abundância dos táxons majoritários e o desfecho da gestação – HCFMUSP – janeiro 2016 a dezembro 2018**

Desfecho	<i>Lactobacillus sp</i>		<i>Lactobacillus iners</i>		<i>Gardnerella</i>	
	p*	FDR**	p*	FDR**	p*	FDR**
<b>PPT &lt; 37 sem</b>	0,042	0,232	0,015	0,171	0,051	0,232
<b>PPT &lt; 34 sem</b>	0,177	0,437	0,004	0,059	0,190	0,437
<b>RPMO</b>	0,070	0,577	0,163	0,577	0,201	0,577
<b>Corioamnionite</b>	0,476	0,939	0,390	0,939	0,562	0,939
<b>Sludge</b>	0,689	0,906	0,563	0,906	0,542	0,906

\* Teste de Mann-Whitney; \*\* Correção pela False Discovery Rate (FDR)

Por outro lado, na análise por ANCOM foi observado uma diminuição significativa de *L.iners* associada ao parto prematuro, tanto abaixo de 37, quanto abaixo de 34 semanas de gestação (**Figura 11**).



**Figura 11 – Abundância diferencial de *L.iners* em relação ao parto prematuro**

ANCOM mostrando a abundância de *Lactobacillus iners* em relação ao parto prematuro abaixo de 37 (**A**) e 34 semanas (**B**). Entre parênteses, o valor *W* correspondente. Eixo vertical: abundância (log); Eixo horizontal: percentis de distribuição; Cor vermelha: parto prematuro; Cor azul: parto a termo.

Analisados em conjunto, os resultados observados na população estudada sugerem que o parto prematuro esteja relacionado a composições com maior dissimilaridade em relação às demais, bem como com menor conteúdo de *L.iners*.



# DISCUSSÃO

---

## 6. DISCUSSÃO

Como dito anteriormente, a ideia central do estudo da microbiota humana por metagenômica é a de que determinados sítios do corpo são colonizados por uma população de micro-organismos selecionados, cuja interação com o hospedeiro garante a manutenção da homeostase do órgão e, conseqüentemente, do organismo. Perturbações fisiológicas ou não fisiológicas na microbiota estariam associadas, como causa ou efeito, à perda da homeostase e doença. Nesse sentido, uma série de associações entre a mudança na microbiota e estados patológicos tem sido descrita em uma variedade de sistemas, notadamente no intestino. Atualmente, com a evolução das tecnologias de metagenômica e metabolômica, o objetivo dessas pesquisas tem sido não somente a descrição da composição da microbiota, mas também dos genes e dos metabólitos que medeiam a interação entre a microbiota e o hospedeiro. Por exemplo, através dos esforços do Projeto Microbioma Humano Integrativo (iHMP) foi possível melhorar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos no parto prematuro associado à colonização bacteriana da cavidade amniótica (113).

Sob um ponto de vista ecológico, o microbioma, juntamente com as interações desses organismos entre si e com o seu meio-ambiente, pode ser considerado um ecossistema. Todo ecossistema funciona no sentido de manter uma condição de estabilidade, ou seja, de “saúde”, e cada um em particular reage de forma diferente a perturbações, conforme a sua composição e complexidade das interações entre os componentes (64). O microbioma vaginal é, por uma série de características, único em relação ao demais sítios do corpo. Em primeiro lugar, na maioria das mulheres apresenta-se com baixa diversidade de espécies e grande predomínio de *Lactobacillus*, cuja ação sobre o glicogênio depositado na mucosa produz ácido láctico, reduzindo o pH e conferindo proteção ao ambiente vaginal. Acredita-se, então, que a acidificação da vagina seja a função primordial desse ecossistema. Porém, a observação de que o ecossistema vaginal de mulheres assintomáticas pode ter maior diversidade, sem predomínio de *Lactobacillus*, indica que, pelo menos em alguns indivíduos, as interações que levam à homeostase podem ser mais complexas. Em segundo

lugar, o microbioma vaginal é dinâmico e sofre alterações temporais, relacionadas à idade, e em resposta a eventos fisiológicos intercorrentes, como a menstruação, atividade sexual e gestação. Dessa maneira, foi demonstrado que, na maioria das mulheres grávidas ocorre uma mudança dramática no microbioma vaginal, no sentido de diminuição da diversidade e aumento do predomínio de *Lactobacillus*. Adicionalmente, os estudos realizados até o momento sugerem que a disbiose associada ao parto prematuro está relacionada à mudança, ou instabilidade, da composição, bem como ao aumento da diversidade, ou seja, diminuição do predomínio de *Lactobacillus*.

Nesse contexto, a proposição deste estudo foi verificar se ocorre mudança na microbiota vaginal de gestantes em resposta à presença de um corpo estranho (pessário) ou estímulo químico (progesterona) que pudesse aumentar o risco de parto prematuro.

Dessa forma, a microbiota vaginal da população estudada mostrou, na maioria dos casos, uma composição com pouca diversidade, largamente dominada por *Lactobacillus*, e que se manteve estável entre os 2 tempos de coleta, concordante com os conceitos atuais sobre a dinâmica da microbiota vaginal na gestação (114). Analisando uma população brasileira semelhante, Witkin et al. (73) mostraram dados semelhantes em relação à composição da microbiota vaginal.

A análise estatística de microbiomas deve ser sempre considerada como uma análise exploratória, uma vez que há várias metodologias disponíveis, cada qual permitindo um tipo de inferência, e que podem ser mais ou menos informativas, de acordo com a composição do ecossistema estudado. Por exemplo, na análise da diversidade beta (**item 5.3.4.**) é possível perceber como as amostras estudadas agrupam-se de maneira diferente de acordo com a métrica aplicada, sendo a dissimilaridade de Bray-Curtis a métrica que melhor discriminou os tipos fundamentais de composição (CSTs). Por outro lado, a maioria dessas metodologias é derivada de estudos clássicos de ecossistemas com organismos vivos, não necessariamente adequadas à análise metagenômica. Nesse sentido, no presente estudo também foram usadas metodologias desenvolvidas especificamente para o estudo de microbiomas, por

exemplo, ANCOM e ANCOM-BC, que corrigem vieses relacionados à análise de sequências de DNA.

Considerando todas as análises realizadas no presente estudo, não foram observadas alterações significativas da microbiota vaginal com relação à diversidade, tipo de composição e abundância dos táxons majoritários após o início do tratamento com pessário ou progesterona. Esses resultados estão em acordo com estudos prévios, por exemplo, Kindinger et al. (61) mostraram que o tratamento com progesterona vaginal em gestantes com risco de parto prematuro não alterou a diversidade alfa e o CST da microbiota vaginal, bem como foi associado ao aumento da abundância de *Lactobacillus*. De forma semelhante, Vargas e al. (78) demonstraram que a microbiota vaginal de gestantes que fizeram uso de pessário não sofreu alterações significativas no CST e na diversidade em relação a um grupo controle. O presente estudo é comparável aos citados acima em termos de desenho e número de casos estudados e, dada a escassez de estudos relacionados, pode ser considerado como um dos primeiros a abordar o tema da influência do tratamento para o colo curto na microbiota vaginal. Os resultados sugerem, portanto, que o pessário de Arabin e a progesterona vaginal, do ponto de vista da microbiota vaginal, sejam seguros e equivalentes.

Adicionalmente, este estudo demonstrou que há correlação entre o aumento da diversidade e do conteúdo de bactérias anaeróbias, como a *Gardnerella*, e o escore de Nugent alterado (>3) da secreção vaginal. Embora seja um resultado esperado, ele reforça a ideia de que a determinação do escore de Nugent tem valor na avaliação de risco para o parto prematuro. De outra forma, também abre a possibilidade de desenvolvimento de biomarcadores para a detecção dessas bactérias, como sugerido por Witkin et al. (73) em relação ao D-lactato e TIMP-1.

Com relação à associação da microbiota vaginal com o parto prematuro, embora a taxa de prematuridade tenha sido grande (8/44), o pequeno número de casos observado dificultou traçar conclusões definitivas. Na maioria dos casos a composição era dominada por *Lactobacillus* e não houve perda da estabilidade do CST. De maneira semelhante, não foi observado um viés claro para os CSTs III e IV nas amostras de parto prematuro, conforme descrito em

outros estudos (58, 59, 61, 72, 73). Por outro lado, foi observada maior dissimilaridade das amostras de parto prematuro em relação às demais e os resultados da ANCOM mostraram que essa dissimilaridade pode ser atribuída à diminuição de *L.iners*. Esses resultados concordam com a demonstração em outros estudos de que o parto prematuro esteja associado à instabilidade da microbiota vaginal, bem como com a diminuição de *Lactobacillus*, conforme descrito anteriormente. Curiosamente, ao contrário do observado por Witkin et al. (73), que estudaram uma população semelhante, a associação entre a diminuição de *L.iners* e o parto prematuro sugere que essa espécie teve uma função protetora na população estudada.

Em conclusão, pode-se afirmar que o presente estudo foi pioneiro na comparação do efeito do uso de pessário de Arabin e progesterona natural na microbiota vaginal. Desse modo, uma perspectiva para a continuação desse estudo seria a extensão da análise, incluindo novas amostras de secreção vaginal colhidas no estudo em curso Pessário x Progesterona do HCFMUSP, o que melhoraria a compreensão desse efeito, sobretudo em relação à ocorrência do parto prematuro. Adicionalmente, a casuística apresentada ainda permitiria outras análises pouco exploradas, como a interação entre bactérias e fungos, já que esses últimos são componentes importantes da microbiota vaginal, bem como a correlação da microbiota com testes funcionais na secreção vaginal, por exemplo, a atividade da enzima sialidase, que está relacionada à presença de bactérias anaeróbias.

# CONCLUSÕES

---

## 7. CONCLUSÕES

A análise da microbiota vaginal de gestantes com colo uterino curto no segundo trimestre da gestação em uso de pessário de Arabin ou de progesterona por via vaginal mostrou que:

- A microbiota vaginal apresentou uma composição com pouca diversidade e predominância de *Lactobacillus* na maioria das amostras analisadas e não houve diferença estatística na diversidade, bem como na abundância dos táxons majoritários (*Lactobacillus sp*, *Lactobacillus iners* e *Gardnerella*) associada ao tratamento;
- Embora tenham sido demonstradas algumas mudanças na composição (CST) após o tratamento, a microbiota vaginal manteve-se estável entre os 2 tempos de coleta;
- O escore de Nugent alterado (>3) correlacionou-se com a maior diversidade da composição e maior abundância de anaeróbios, incluindo a *Gardnerella*;
- O parto prematuro foi associado à dissimilaridade da microbiota e à diminuição da abundância de *Lactobacillus iners*;
- Não foram observadas associações entre os demais desfechos gestacionais, bem como com a presença de *sludge* cervical e a composição ou diversidade da microbiota vaginal;
- Pelos resultados observados, pessário e progesterona são equivalentes em relação à ocorrência de alterações da microbiota vaginal.

# ANEXOS

---



## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
USP - HCFMUSP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** COMPARAÇÃO ENTRE A PROGESTERONA NATURAL E O PESSÁRIO VAGINAL NA PREVENÇÃO DO PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO EM GESTANTES COM COLO UTERINO MENOR OU IGUAL A 25mm

**Pesquisador:** Mario Henrique Burlacchini de Carvalho

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 20611813.0.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP  
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 470.095

**Data da Relatoria:** 06/11/2013

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo envolvendo prematuridade, principal causa de morbidade e de mortalidade neonatal. Os autores afirmam que as taxas de parto prematuro espontâneo não apresentaram variações nos últimos 10 anos e uma redução nas taxas de mortalidade e morbidade em bebês prematuros só será possível com o desenvolvimento de uma prevenção efetiva. Mulheres assintomáticas com colo uterino curto (< 25 mm medido na ultrassonografia transvaginal) têm risco aumentado de parto prematuro espontâneo. O uso profilático de progesterona no início da gestação, em mulheres com antecedente de parto prematuro anterior e aquelas com presença de colo curto, é uma forma de prevenção ao parto prematuro antes de 34 semanas de gestação e o pessário cervical é um dispositivo que tem sido usado para prevenção de parto prematuro. A medida do comprimento cervical, como teste de rastreamento, é usada devido ao seu baixo custo, curta curva de aprendizado e tolerância das pacientes. O estudo irá comparar a eficácia do pessário cervical e da progesterona natural na redução do parto prematuro de gestantes com colo uterino medindo 25 mm ou menos, avaliada pela ultrassonografia transvaginal.

##### Objetivo da Pesquisa:

Comparar a incidência de partos abaixo de 34 semanas gestacionais na população em uso de

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 470.095

pessário cervical ou em uso de progesterona natural.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos decorrentes dos procedimentos realizados para o estudo já foram descritos na literatura (não há riscos adicionais) e os autores esperam identificar qual a melhor forma de prevenção de parto prematuro em gestantes com colo uterino medindo 25mm ou menos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo é bem descrito e tem objetivo preciso, comparar dois métodos de tratamento já existentes, porém ainda sem definição de superioridade. A introdução traz dados atuais da literatura e os métodos estão definidos de forma clara e detalhada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados

**Recomendações:**

Aprovação

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovação

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 470.095

SAO PAULO, 27 de Novembro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Luiz Eugênio Garcez Leme**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar      **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP      **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585      **Fax:** (11)2661-7585      **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

## 8.2. ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupos progesterona e pêsário

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO-HCFMUSP  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

**1. SUJEITO DA PESQUISA**

NOME: .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO : .M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº: ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

**2. RESPONSÁVEL LEGAL**

NOME: .....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO : .M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD(.....).....

---

**DADOS SOBRE A PESQUISA**

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Comparação entre a progesterona natural e o pêsário vaginal na prevenção do parto prematuro espontâneo em gestantes com colo uterino menor ou igual a 25 mm**

PESQUISADOR: Mário Henrique Burlacchini de Carvalho

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado da Disciplina de Obstetrícia FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº 80872

PESQUISADORES e COLABORADORES: Juliana Valente Codato Marinelli, Priscila Teixeira do Amaral, Antonio Gomes de Amorim Filho, Roberto Eduardo Bittar, Rossana Pulcineli Vieira Francisco, Marcelo Zugaib

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Obstétrica

**3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**

RISCO MÍNIMO (x) RISCO MÉDIO ( ) RISCO BAIXO ( ) RISCO MAIOR ( )

**4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos**

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Estamos convidando você a participar de uma pesquisa que tem como objetivo comparar se há diferença entre um anel de silicone e a progesterona natural na redução do parto prematuro de gestantes com colo uterino medindo 25 mm ou menos, avaliado pela ultrassonografia transvaginal. O pessário cervical é um anel de silicone que é introduzido na vagina pelo exame de toque e posicionado próximo ao colo do útero durante a gravidez. Estamos estudando se esse anel pode ajudar a prevenir o parto antes de 9 meses ou não. O pessário não é prejudicial para você ou para seu bebê, e não deve incomodá-la. Porém, se você quiser, poderá retirar o anel a qualquer momento. Nas pacientes que forem usar progesterona, serão utilizados 2 óvulos vaginais à noite, no momento de dormir. A progesterona é uma medicação que já utilizamos para gestantes de risco para parto prematuro ou quando tem a medida do colo uterino menor ou igual a 25mm. Na 37ª semana, quando diminui o risco da prematuridade, o pessário será removido e o uso dos óvulos de progesterona será suspenso. Todas as pacientes participantes do estudo serão acompanhadas mensalmente com a medida do colo uterino e avaliação das contrações utilizando o aparelho de tocografia durante o período de uma hora. Esse aparelho é colocado no abdome, fixado com uma fita e não provoca nenhum desconforto em você. Além disso, serão coletadas amostras da sua secreção vaginal para pesquisa de infecções. Esse procedimento é semelhante à coleta de um papanicolau, não traz risco à sua gestação e é normalmente feito nas gestações de alto risco. A secreção vaginal também será levada ao nosso laboratório, onde testaremos uma nova técnica de estudo de infecções. A participação nesta pesquisa não aumenta o risco para você ou seu bebê.

Com este estudo tentaremos: verificar se há diferença entre o pessário e a progesterona na diminuição do risco de ter o parto antes de 9 meses nas mulheres com colo uterino curto.

Trata-se de estudo experimental e somente no final do estudo poderemos concluir se há alguma diferença na utilização do anel ou da progesterona.

Para este estudo estamos convidando gestantes entre 20 e 23 semanas e 6 dias e bolsa das águas íntegra.

Faz parte desta pesquisa uma entrevista detalhada sobre o histórico obstétrico que deve ter duração de aproximadamente 15 minutos e será realizada por pesquisadores envolvidos no projeto.

Ao participar desta pesquisa, você não terá nenhum benefício direto. No entanto, esperamos que este estudo traga informações importantes para que possamos diminuir a alta taxa de prematuridade na população.

Como procedimento alternativo, você pode optar em não participar da pesquisa, e faremos todos os exames que são necessários para o acompanhamento do seu caso.

A qualquer momento você tem acesso garantido aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas com o **Dr Mário Henrique Burlacchini de Carvalho**, que pode ser encontrado na Clínica Obstétrica, 10º andar do Instituto Central do Hospital das Clínicas, na Av Enéas de Carvalho Aguiar N 255, Telefone 2661-6380 ou com a pesquisadora **Juliana Valente Codato Marinelli** (tel: 99691-1245).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: [marcia.carvalho@hc.fm.usp.br](mailto:marcia.carvalho@hc.fm.usp.br).

Você pode retirar este consentimento e desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na instituição.

Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo, seu nome e das demais pacientes não será divulgado em nenhuma publicação, e os dados serão utilizados exclusivamente para os fins científicos desta pesquisa.

Você poderá se manter atualizada sobre os resultados parciais desta pesquisa, podendo questionar a qualquer momento sobre as informações obtidas ou os resultados que sejam do conhecimento do pesquisador.

Não há despesas pessoais para você caso decida participar. Também não há compensação financeira.

Garantimos que os dados e os exames realizados serão utilizados somente com o objetivo proposto nesta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo.

Eu discuti com o os pesquisadores sobre a minha decisão em participar desse 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, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste serviço.

-----  
Assinatura do paciente/representante legal

Data: São Paulo, / /

-----  
Assinatura da testemunha (em casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Data: São Paulo, / /

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

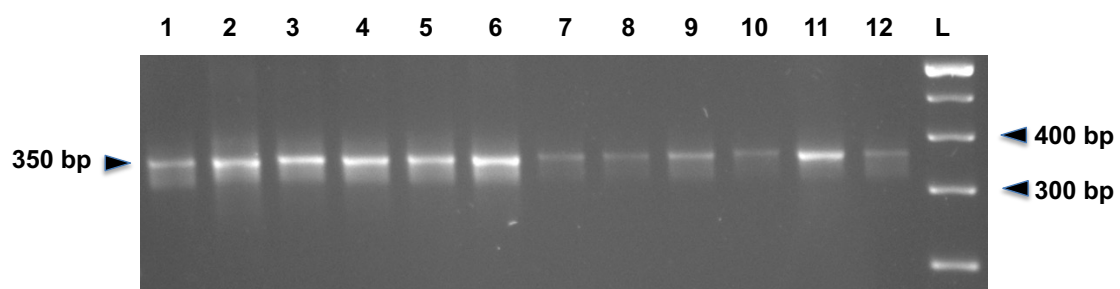
Data: São Paulo, / /

### 8.3. ANEXO C – Sequências dos primers utilizados para sequenciamento da região V4 do gene 16S

	PRIMER COMPLETO	ADAPTADOR	BARCODE	16S
R806_trP1_rev	CCCTCTCATGGGAGTGGTGGTACTACHVGGGTWCTAAT			
F515_16S (for) -BC-01	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTAAAGTAAACGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	CTAAGGTAA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-02	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTAAAGGAAACGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TAAGGAGAA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-03	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGAAAGAGATTGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	AAGAGGATT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-04	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTAAAGATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TACCAAGAT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-05	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGCAAGAAAGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	CAGAAGGAA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-06	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCAAGTTGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	CTGCAAGTT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-07	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTTCGGTATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TTCGTGATT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-08	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCCGATAAGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCCGATAA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-09	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTGAAGCGAAGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TGAGCGGAA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-10	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCAAGAAAGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	CTGACCGAA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-11	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCTGATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCTGATGAT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-12	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTGGTGTGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TAGTGGTT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-13	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCAAGAAAGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCTAAGGAA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-14	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTGGATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TGAGATGT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-15	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAGGTGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCTAGAGGT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-16	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCTGGATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCTGGATGA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-17	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTATTGATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCTATTGAT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-18	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGAGCAATTGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	AGGCAATTG	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-19	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTGTAGTGGAGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TGAGTCGGA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-20	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGCAGATCCATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	CAGATCCAT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-21	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCCGAAATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCCGAAATG	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-22	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTTCGAGAGGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TTCGAGAGG	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-23	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCCAGCAAGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCCAGCAAG	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-24	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGAAACTCATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	AACTCATAT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-25	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGCTGAGATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	GCTGAGATA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-26	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTTACAACCTGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TTACAACCT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-27	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGAACCATCCGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	AACCATCCG	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-28	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGATCCGAAATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	ATCCGAAAT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-29	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCCGAACTGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCCGAACTG	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-30	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGCGAGGTTATGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	CGAGGTTAT	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-31	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTCCAAAGTGGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCCAAAGTG	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA
F515_16S (for) -BC-32	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAGTTACACAGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA	CCATCTCATCCCTGGGTGTCTCCGACTCAG	TCTTACACA	CGATGTGCCAGCMGCCCGGTAA

#### 8.4. ANEXO D – Verificação da qualidade dos *amplicons* do gene 16S rRNA

**Construção das bibliotecas para sequenciamento.** Gel de agarose a 3% mostrando a amplificação do fragmento de 350 bp correspondente à região V4 do rDNA . Canaletas 1 a 12: amostras de secreção vaginal; L: padrões de peso molecular

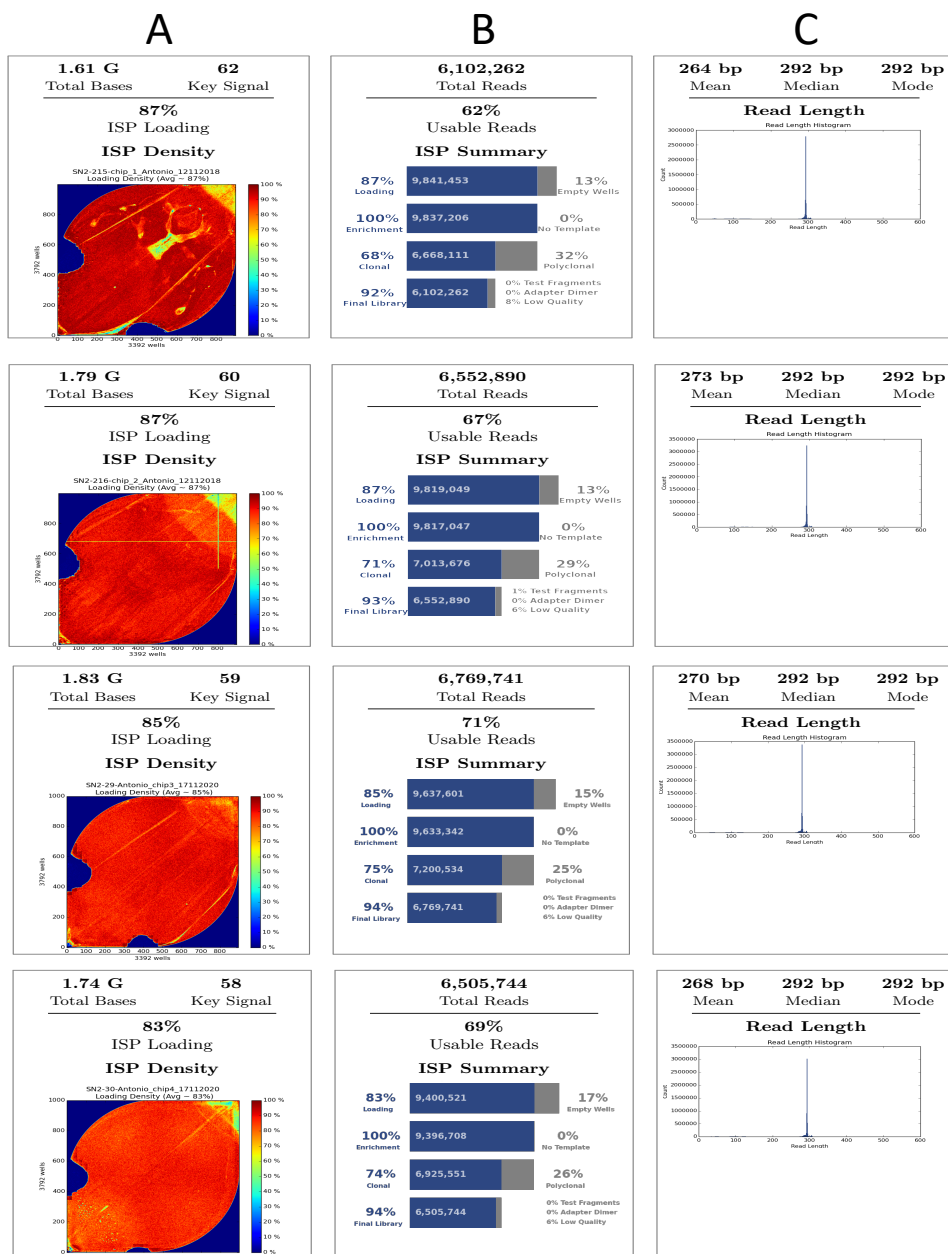




## 8.5. ANEXO E – Verificação da qualidade do sequenciamento

Relatório de qualidade do sequenciamento no Ion Torrent PGM com *chips* 318.

**A:** mapa de calor da densidade de carregamento dos *chips*; **B:** filtragem inicial das seqüências obtidas; **C:** distribuição das seqüências obtidas de acordo com o tamanho da cadeia.



# REFERÊNCIAS

---

## 9. REFERÊNCIAS

1. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84.
2. March of Dimes P, Save the Children, WHO. *Born Too Soon: The Global Action Report On Preterm Birth* Geneva: World Health Organization; 2012 [
3. SINASC. Ministério da Saúde - Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos - SINASC 2019 [Available from: [tabnet.datasus.gov.br](http://tabnet.datasus.gov.br).
4. Leal MdC, Esteves-Pereira AP, Nakamura-Pereira M, Torres JA, Theme-Filha M, Domingues RMSM, et al. Prevalence and risk factors related to preterm birth in Brazil. *Reproductive Health*. 2016;13(3):127.
5. Bittar R. Parto Pré-termo. *Revista de Medicina*. 2018;97(2):195-207.
6. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG*. 2006;113 Suppl 3:17-42.
7. Mendz GL, Kaakoush NO, Quinlivan JA. Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2013;3:58.
8. Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS, Cliver SP, Goldenberg RL, Hauth JC. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. *Journal of the American Dental Association (1939)*. 2001;132(7):875-80.
9. Mercer BM, Goldenberg RL, Moawad AH, Meis PJ, Iams JD, Das AF, et al. The preterm prediction study: effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;181(5 Pt 1):1216-21.
10. Iams JD. Clinical practice. Prevention of preterm parturition. *N Engl J Med*. 2014;370(3):254-61.

11. de Carvalho MH, Bittar RE, Brizot MeL, Bicudo C, Zugaib M. Prediction of preterm delivery in the second trimester. *Obstet Gynecol.* 2005;105(3):532-6.
12. McIntosh J, Feltovich H, Berghella V, Manuck T. The role of routine cervical length screening in selected high- and low-risk women for preterm birth prevention. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(3):B2-7.
13. Conde-Agudelo A, Romero R. Vaginal progesterone to prevent preterm birth in pregnant women with a sonographic short cervix: clinical and public health implications. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214(2):235-42.
14. Fonseca EB, Celik E, Parra M, Singh M, Nicolaides KH. Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix. *N Engl J Med.* 2007;357(5):462-9.
15. Romero R, Nicolaides KH, Conde-Agudelo A, O'Brien JM, Cetingoz E, Da Fonseca E, et al. Vaginal progesterone decreases preterm birth  $\leq$  34 weeks of gestation in women with a singleton pregnancy and a short cervix: an updated meta-analysis including data from the OPPTIMUM study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;48(3):308-17.
16. ACOG Practice Bulletin No.142: Cerclage for the management of cervical insufficiency. *Obstet Gynecol.* 2014;123(2 Pt 1):372-9.
17. Goya M, Pratcorona L, Merced C, Rodó C, Valle L, Romero A, et al. Cervical pessary in pregnant women with a short cervix (PECEP): an open-label randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;379(9828):1800-6.
18. Hui SY, Chor CM, Lau TK, Lao TT, Leung TY. Cerclage pessary for preventing preterm birth in women with a singleton pregnancy and a short cervix at 20 to 24 weeks: a randomized controlled trial. *Am J Perinatol.* 2013;30(4):283-8.
19. Nicolaides KH, Syngelaki A, Poon LC, Picciarelli G, Tul N, Zamprakou A, et al. A Randomized Trial of a Cervical Pessary to Prevent Preterm Singleton Birth. *N Engl J Med.* 2016;374(11):1044-52.

20. Pacagnella RC, Silva TV, Cecatti JG, Passini R, Jr., Fanton TF, Borovac-Pinheiro A, et al. Pessary Plus Progesterone to Prevent Preterm Birth in Women With Short Cervixes: A Randomized Controlled Trial. *Obstet Gynecol.* 2022;139(1):41-51.
21. Saccone G, Ciardulli A, Xodo S, Dugoff L, Ludmir J, Pagani G, et al. Cervical Pessary for Preventing Preterm Birth in Singleton Pregnancies With Short Cervical Length: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Ultrasound Med.* 2017;36(8):1535-43.
22. Falcão V, Melo C, Matias A, Montenegro N. Cervical pessary for the prevention of preterm birth: is it of any use? *J Perinat Med.* 2017;45(1):21-7.
23. Corrêa TD, Amorim EG, Tomazelli JAG, Corrêa MDJ. Use of the Pessary in the Prevention of Preterm Delivery. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2019;41(1):53-8.
24. Witkin SS, Linhares IM. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *Bjog.* 2017;124(4):606-11.
25. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of clinical microbiology.* 1991;29(2):297-301.
26. Iams JD, Goldenberg RL, Meis PJ, Mercer BM, Moawad A, Das A, et al. The length of the cervix and the risk of spontaneous premature delivery. National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Unit Network. *N Engl J Med.* 1996;334(9):567-72.
27. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N Engl J Med.* 1995;333(26):1737-42.

28. Carvalho MHBd, Bittar RE, Maganha PPdAeS, Pereira SV, Zugaib M. Associação da Vaginose Bacteriana com o Parto Prematuro Espontâneo. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2001;23:529-33.
29. Krohn MA, Hillier SL, Nugent RP, Cotch MF, Carey JC, Gibbs RS, et al. The genital flora of women with intraamniotic infection. *Vaginal Infection and Prematurity Study Group. The Journal of infectious diseases*. 1995;171(6):1475-80.
30. Hillier SL, Krohn MA, Cassen E, Easterling TR, Rabe LK, Eschenbach DA. The role of bacterial vaginosis and vaginal bacteria in amniotic fluid infection in women in preterm labor with intact fetal membranes. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1995;20 Suppl 2:S276-8.
31. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *Bjog*. 2009;116(10):1315-24.
32. Donders G, Bellen G, Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *Bjog*. 2011;118(10):1163-70.
33. Cotch MF, Pastorek JG, 2nd, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH, et al. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Sexually transmitted diseases*. 1997;24(6):353-60.
34. Sweet RL, Landers DV, Walker C, Schachter J. Chlamydia trachomatis infection and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 1987;156(4):824-33.
35. Donders GG, Desmyter J, De Wet DH, Van Assche FA. The association of gonorrhoea and syphilis with premature birth and low birthweight. *Genitourinary medicine*. 1993;69(2):98-101.

36. Romero R, Gonzalez R, Sepulveda W, Brandt F, Ramirez M, Sorokin Y, et al. Infection and labor. VIII. Microbial invasion of the amniotic cavity in patients with suspected cervical incompetence: prevalence and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167(4 Pt 1):1086-91.
37. Bujold E, Morency AM, Rallu F, Ferland S, Tetu A, Duperron L, et al. Bacteriology of amniotic fluid in women with suspected cervical insufficiency. *J Obstet Gynaecol Can.* 2008;30(10):882-7.
38. Romero R, Gomez-Lopez N, Winters AD, Jung E, Shaman M, Bieda J, et al. Evidence that intra-amniotic infections are often the result of an ascending invasion – a molecular microbiological study. *Journal of Perinatal Medicine.* 2019;47(9):915-31.
39. Owen J, Iams JD, Hauth JC. Vaginal sonography and cervical incompetence. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(2):586-96.
40. Donders GG, Van Calsteren C, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, et al. Association between abnormal vaginal flora and cervical length as risk factors for preterm birth. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010.
41. Jefferson KK. The Bacterial Etiology of Preterm Birth. In: Sariaslani S, Gadd GM, editors. *Advances in Applied Microbiology.* 80. Burlington: Academic Press; 2012. p. 1-22.
42. NIH. Human Microbiome Project [Available from: <http://www.hmpdacc.org>.
43. White BA, Creedon DJ, Nelson KE, Wilson BA. The vaginal microbiome in health and disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2011;22(10):389-93.
44. Prince AL, Antony KM, Chu DM, Aagaard KM. The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers. *Journal of reproductive immunology.* 2014.

45. Fettweis JM, Serrano MG, Girerd PH, Jefferson KK, Buck GA. A new era of the vaginal microbiome: advances using next-generation sequencing. *Chemistry & biodiversity*. 2012;9(5):965-76.
46. Ganu RS, Ma J, Aagaard KM. The role of microbial communities in parturition: is there evidence of association with preterm birth and perinatal morbidity and mortality? *Am J Perinatol*. 2013;30(8):613-24.
47. Mysorekar IU, Cao B. Microbiome in parturition and preterm birth. *Seminars in reproductive medicine*. 2014;32(1):50-5.
48. Fettweis JM, Serrano MG, Sheth NU, Mayer CM, Glascock AL, Brooks JP, et al. Species-level classification of the vaginal microbiome. *BMC Genomics*. 2012;13(Suppl 8).
49. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4680-7.
50. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schutte UM, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Science translational medicine*. 2012;4(132):132ra52.
51. Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta TA, Coarfa C, et al. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One*. 2012;7(6):e36466.
52. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW, Nikita L, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*. 2014;2(1):4.
53. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. 2015.



54. MacIntyre DA, Chandiramani M, Lee YS, Kindinger L, Smith A, Angelopoulos N, et al. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Scientific reports*. 2015;5:8988.
55. Serrano MG, Parikh HI, Brooks JP, Edwards DJ, Arodz TJ, Edupuganti L, et al. Racioethnic diversity in the dynamics of the vaginal microbiome during pregnancy. *Nature Medicine*. 2019;25(6):1001-11.
56. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosch DW, Bieda J, et al. The vaginal microbiota of pregnant women who subsequently have spontaneous preterm labor and delivery and those with a normal delivery at term. *Microbiome*. 2014;2:18.
57. Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, Fung E, Rand L, Johnson B, et al. Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)*. 2014;21(1):32-40.
58. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(35):11060-5.
59. Callahan BJ, DiGiulio DB, Goltsman DSA, Sun CL, Costello EK, Jeganathan P, et al. Replication and refinement of a vaginal microbial signature of preterm birth in two racially distinct cohorts of US women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(37):9966-71.
60. Stout MJ, Zhou Y, Wylie KM, Tarr PI, Macones GA, Tuuli MG. Early pregnancy vaginal microbiome trends and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;217(3):356.e1-.e18.
61. Kindinger LM, Bennett PR, Lee YS, Marchesi JR, Smith A, Cacciatore S, et al. The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. *Microbiome*. 2017;5(1):6.

62. Freitas AC, Bocking A, Hill JE, Money DM. Increased richness and diversity of the vaginal microbiota and spontaneous preterm birth. *Microbiome*. 2018;6(1):117.
63. Kroon SJ, Ravel J, Huston WM. Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertil Steril*. 2018;110(3):327-36.
64. Greenbaum S, Greenbaum G, Moran-Gilad J, Weintraub AY. Ecological dynamics of the vaginal microbiome in relation to health and disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2019;220(4):324-35.
65. Fettweis JM, Serrano MG, Brooks JP, Edwards DJ, Girerd PH, Parikh HI, et al. The vaginal microbiome and preterm birth. *Nature Medicine*. 2019;25(6):1012-21.
66. Feehily C, Crosby D, Walsh CJ, Lawton EM, Higgins S, McAuliffe FM, et al. Shotgun sequencing of the vaginal microbiome reveals both a species and functional potential signature of preterm birth. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2020;6(1):50.
67. Petrova MI, Reid G, Vaneechoutte M, Lebeer S. *Lactobacillus iners*: Friend or Foe? *Trends in microbiology*. 2017;25(3):182-91.
68. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. *MBio*. 2013;4(4).
69. Nunn KL, Wang YY, Harit D, Humphrys MS, Ma B, Cone R, et al. Enhanced Trapping of HIV-1 by Human Cervicovaginal Mucus Is Associated with *Lactobacillus crispatus*-Dominant Microbiota. *MBio*. 2015;6(5):e01084-15.
70. Doerflinger SY, Throop AL, Herbst-Kralovetz MM. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *The Journal of infectious diseases*. 2014;209(12):1989-99.

71. Anahtar MN, Byrne EH, Doherty KE, Bowman BA, Yamamoto HS, Soumillon M, et al. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity*. 2015;42(5):965-76.
72. Kindinger LM, MacIntyre DA, Lee YS, Marchesi JR, Smith A, McDonald JA, et al. Relationship between vaginal microbial dysbiosis, inflammation, and pregnancy outcomes in cervical cerclage. *Science translational medicine*. 2016;8(350):350ra102.
73. Witkin SS, Moron AF, Ridenhour BJ, Minis E, Hatanaka A, Sarmiento SGP, et al. Vaginal Biomarkers That Predict Cervical Length and Dominant Bacteria in the Vaginal Microbiomes of Pregnant Women. *mBio*. 2019;10(5).
74. Paramel Jayaprakash T, Wagner EC, van Schalkwyk J, Albert AY, Hill JE, Money DM. High Diversity and Variability in the Vaginal Microbiome in Women following Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM): A Prospective Cohort Study. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166794.
75. Brown RG, Marchesi JR, Lee YS, Smith A, Lehne B, Kindinger LM, et al. Vaginal dysbiosis increases risk of preterm fetal membrane rupture, neonatal sepsis and is exacerbated by erythromycin. *BMC medicine*. 2018;16(1):9.
76. Brown RG, Al-Memar M, Marchesi JR, Lee YS, Smith A, Chan D, et al. Establishment of vaginal microbiota composition in early pregnancy and its association with subsequent preterm prelabor rupture of the fetal membranes. *Transl Res*. 2019;207:30-43.
77. Brown RG, Chan D, Terzidou V, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, et al. Prospective observational study of vaginal microbiota pre- and post-rescue cervical cerclage. *Bjog*. 2019.
78. Vargas M, Yañez F, Elias A, Bernabeu A, Goya M, Xie Z, et al. Cervical pessary and cerclage placement for preterm birth prevention and cervicovaginal microbiome changes. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2022;101(12):1403-13.

79. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013 [Available from: <http://www.R-project.org/>].
80. To MS, Skentou C, Chan C, Zagaliki A, Nicolaides KH. Cervical assessment at the routine 23-week scan: standardizing techniques. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001;17(3):217-9.
81. Garcia LS, Isenberg HD. *Clinical microbiology procedures handbook*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2010.
82. Girdner JL, Cullen AP, Salama TG, He L, Lorincz A, Quinn TC. Evaluation of the digene hybrid capture II CT-ID test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. *Journal of clinical microbiology.* 1999;37(5):1579-81.
83. Abbott RealTime CT/NG[package insert]. Des Plaines, IL: Abbott Molecular. 2007 [Available from: <https://www.molecular.abbott/int/en/products/infectious-disease/realtime-ct-ng>].
84. Forney LJ, Gajer P, Williams CJ, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Comparison of self-collected and physician-collected vaginal swabs for microbiome analysis. *Journal of clinical microbiology.* 2010;48(5):1741-8.
85. PowerSoil DNA isolation kit. Instructions manual. [Available from: <https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12888.pdf>].
86. Qubit 4 fluorometer user guide. [Available from: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017209\\_Qubit\\_4\\_Fluorometer\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017209_Qubit_4_Fluorometer_UG.pdf)].
87. Ion PGM Hi-Q View Chef Kits User Guide [Available from: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014571\\_IonPGM\\_HiQ\\_View\\_Chef\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014571_IonPGM_HiQ_View_Chef_UG.pdf)].

88. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5):335-6.
89. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. 2019;37(8):852-7.
90. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*. 2016;13(7):581.
91. Mirarab S, Nguyen N, Warnow T. SEPP: SATé-enabled phylogenetic placement. *Pac Symp Biocomput*. 2012:247-58.
92. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. 2018;6(1):90.
93. Greengenes. The 16S rRNA database and tools. [Available from: <http://greengenes.secondgenome.com/downloads>.
94. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*. 2012;6(3):610-8.
95. Paulino C, Singer J. **Análise de Dados Categorizados**: Edgard Blücher; 2006.
96. Singer J. Análise não-paramétrica de medidas repetidas (Analysis of nonparametric repeated data) [Available from: <https://www.ime.usp.br/~jmsinger/doku.php>.

97. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W180-w8.
98. Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols.* 2020;15(3):799-821.
99. Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs.* 1957;27(4):325-49.
100. Legendre P, Legendre L. Chapter 7 - Ecological resemblance. In: Legendre P, Legendre L, editors. *Developments in Environmental Modelling.* 24: Elsevier; 2012. p. 265-335.
101. Mc NQ. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika.* 1947;12(2):153-7.
102. Kim BR, Shin J, Guevarra R, Lee JH, Kim DW, Seol KH, et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(12):2089-93.
103. Lin H, Peddada SD. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications.* 2020;11(1):3514.
104. Chen Y, Lin H, Cole M, Morris A, Martinson J, McKay H, et al. Signature changes in gut microbiome are associated with increased susceptibility to HIV-1 infection in MSM. *Microbiome.* 2021;9(1):237.
105. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(5):1576-85.
106. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology.* 2005;71(12):8228--35.

107. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and Qualitative  $\beta$  Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(5):1576--85.
108. Gower JC. Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis. *Biometrika*. 1966;53(3/4):325-38.
109. Vázquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaScience*. 2013;2(1):16.
110. Legendre P, Legendre L. Chapter 1 - Complex ecological data sets. In: Legendre P, Legendre L, editors. *Developments in Environmental Modelling*. 24: Elsevier; 2012. p. 1-57.
111. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.
112. Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2015;26(1):27663.
113. Proctor LM, Creasy HH, Fettweis JM, Lloyd-Price J, Mahurkar A, Zhou W, et al. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 2019;569(7758):641-8.
114. Dominguez-Bello MG. Gestational shaping of the maternal vaginal microbiome. *Nature Medicine*. 2019;25(6):882-3.