

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à
Oftalmologia

Múcio Barata Diniz

RESPOSTA IMUNE E FUNÇÃO DO ASSOALHO PÉLVICO APÓS
NEOVAGINOPLASTIA E DILATAÇÃO EM MULHERES COM AGENESIA DE
VAGINA: um estudo comparativo

Belo Horizonte

2025

Mucio Barata Diniz

**RESPOSTA IMUNE E FUNÇÃO DO ASSOALHO PÉLVICO APÓS
NEOVAGINOPLASTIA E DILATAÇÃO EM MULHERES COM AGENESIA DE
VAGINA: um estudo comparativo**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Cicatrização
Fatores intervenientes na cicatrização

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Vale de Castro Monteiro

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Pascoal Antônio Xavier

Belo Horizonte

2025

D585r Diniz, Múcio Barata.
Resposta Imune e função do Assoalho Pélvico após Neovaginoplastia e dilatação em mulheres com Agenesia de Vagina [recurso eletrônico]: um estudo comparativo. / Múcio Barata Diniz. - - Belo Horizonte: 2025.
73f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Marilene Vale de Castro Monteiro.
Coorientador (a): Marcelo Pascoal Antônio Xavier.
Área de concentração: Cicatrização.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Vagina. 2. Diafragma da Pelve. 3. Dilatação. 4. Qualidade de Vida. 5. Imunidade. 6. Dissertação Acadêmica. I. Monteiro, Marilene Vale de Castro. II. Xavier, Marcelo Pascoal Antônio. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WP 250

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Às catorze horas e trinta minutos do dia dez de julho de dois mil e vinte e cinco, na Faculdade de Medicina, na sala 526, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **MÚCIO BARATA DINIZ**. A presidência da sessão coube a Profa. Marilene Vale de Castro Monteiro (Orientadora) – UFMG. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Marilene Vale de Castro Monteiro (Orientadora) – UFMG, Elyonara Mello de Figueiredo – UFMG, Leonardo Robson Pinheiro Sobreira Bezerra – UFC, Paula Piedade Garcia – UFMG e Eduardo Batista Cândido – UFMG. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: RESPOSTA IMUNE E FUNÇÃO DO ASSOALHO PÉLVICO APÓS NEOVAGINOPLASTIA E DILATAÇÃO EM MULHERES COM AGENESIA DE VAGINA: UM ESTUDO COMPARATIVO. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar aprovado a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 10 de julho de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Elyonara Mello de Figueiredo, Professora do Magistério Superior**, em 11/07/2025, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Batista Candido, Professor do Magistério Superior**, em 11/07/2025, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marilene Vale de Castro Monteiro, Professor(a)**, em 11/07/2025, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Piedade Garcia, Professora do Magistério Superior**, em 11/07/2025, às 19:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Robson Pinheiro Sobreira Bezerra, Usuário Externo**, em 28/07/2025, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4302390** e o código CRC **91E41324**.

A Adriene Campos, médica,
radiologista e cantora, companheira
de uma vida, desde a faculdade.

AGRADECIMENTOS

À Marilene Monteiro, que possui as qualidades necessárias para ser uma verdadeira professora e formadora de médicos, com dedicação, conhecimento, paciência e benevolência.

Aos Professores da pós-graduação, que tanto contribuíram para minha formação.

A todos que contribuíram para esse trabalho. Em especial a Marcelo Antônio Pascoal Xavier, Janca Evelin de Paula Viglioni, Elyonara Mello Figueiredo, Marina Resende Godoy, Debora Lucas Macharet, Roberta Abramo e Luísa Campos que foram fundamentais para a elaboração do estudo.

Aos membros da banca, professores: Profa. Marilene Vale de Castro Monteiro (Orientadora) UFMG, Profa. Elyonara Mello de Figueredo UFMG, Prof. Leonardo Robson Pinheiro Sobreira Bezerra UFC, Profa. Paula Piedade Garcia UFMG, Prof. Eduardo Batista Candido – UFMG, Profa. Glauca Miranda Varella Pereira (suplente) UNICAMP , Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier (coorientador) UFMG

RESUMO

Objetivo: Avaliar os tratamentos cirúrgico e por dilatação em mulheres com agenesia vaginal na resposta imune vaginal, nas funções musculares do assoalho pélvico, na função sexual e na qualidade de vida um ano após a intervenção. **Materiais e métodos:** estudo observacional transversal de pacientes com agenesia vaginal atendidas no setor de Uroginecologia da UFMG. As participantes optaram por neovaginoplastia (grupo 1) ou por dilatação vaginal (grupo 2). Aos 12 meses de seguimento, foram avaliados o comprimento e amplitude de vagina, pesquisa de HPV, perfil da microbiota vaginal, Ph vaginal, exame histopatológico, citopatológica, pesquisa de imunoproteoma, avaliação das funções do assoalho pélvico, qualidade de vida e função sexual. **Resultados:** Foram incluídas 11 mulheres com agenesia vaginal: 6 no grupo 1 e 5 no grupo 2, com idade média de 26,3 anos. Dez apresentavam cariótipo 46,XX (Síndrome de Rokitansky) e uma 46,XY (Síndrome de Morris). O comprimento médio vaginal final foi 8 cm no grupo 1 e 5 cm no grupo 2 ($p= 0,004$). O exame citopatológico foi positivo em uma paciente do grupo 1 (HSIL, lesão escamosa de alto grau) e em duas do grupo 2 (2 ASC-US, atipia de significado indeterminado). A pesquisa de DNA de HPV de alto risco foi positiva em duas pacientes de cada grupo. A análise da microbiota vaginal revelou Ph médio de 5,0 e predomínio de flora lactobacilar em 80% das pacientes do grupo 2 e Ph médio de 7,3 com predomínio de flora não lactobacilar em 83,3% das pacientes do grupo 1. A maioria das participantes do grupo 2 (80%) apresentaram epitélio escamoso em múltiplos cortes. No grupo 1, houve ausência de epitélio escamoso estratificado nas amostras ($p= 0,002$). As concentrações dos biomarcadores avaliados demonstraram similaridade entre os dois grupos. A avaliação da função muscular não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Quanto a qualidade de vida não houve diferença entre os grupos. **Conclusão:** A resposta imune e a função do assoalho pélvico foram semelhantes entre os dois grupos na avaliação aos 12 meses, e ambos apresentaram bons resultados. O rastreio de HPV nessas pacientes deve ser discutido..

Palavras-chave: agenesia vaginal; síndrome de Rokitansky; neovaginoplastia; imunidade vaginal; assoalho pélvico.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effects of surgical and dilation treatments on the vaginal immune response, pelvic floor muscle function, sexual function, and quality of life in women with vaginal agenesis one year after the intervention.

Materials and methods: This was a cross-sectional observational study of patients with vaginal agenesis treated at the Urogynecology Department of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Participants opted for neovaginoplasty (group 1) or vaginal dilation (group 2). At 12 months of follow-up, vaginal length and width, HPV testing, vaginal microbiota profile, vaginal pH, histopathological and cytopathological examination, immunoproteomic testing, pelvic floor function assessment, quality of life, and sexual function were assessed. **Results:** Eleven women with vaginal agenesis were included: 6 in group 1 and 5 in group 2, with a mean age of 26.3 years. Ten patients had a 46,XX karyotype (Rokitansky syndrome) and one had a 46,XY karyotype (Morris syndrome). The mean final vaginal length was 8 cm in group 1 and 5 cm in group 2 ($p = 0.004$). Cytopathological examination was positive in one patient in group 1 (HSIL, high-grade squamous lesion) and in two in group 2 (2 ASC-US, atypia of undetermined significance). High-risk HPV DNA testing was positive in two patients in each group. Analysis of the vaginal microbiota revealed a mean pH of 5.0 and a predominance of lactobacillary flora in 80% of patients in group 2 and a mean pH of 7.3 with a predominance of non-lactobacillary flora in 83.3% of patients in group 1. Most patients in group 2 (80%) had squamous epithelium in multiple sections. In group 1, there was no stratified squamous epithelium in the samples ($p=0.002$). The concentrations of the biomarkers evaluated showed similarity between the two groups. The assessment of muscle function showed no significant differences between the groups. Regarding quality of life, there was no difference between the groups. **Conclusion:** The immune response and pelvic floor function were similar between the two groups at the 12-month assessment, and both presented good results. HPV screening in these patients should be discussed.

Keywords: vaginal agenesis; Rokitansky syndrome; neovaginoplasty; vaginal immunity; pelvic floor.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Fluxograma do recrutamento das pacientes..... | 64 |
| Figura 2: Quantificação dos biomarcadores do líquido vaginal..... | 65 |
| Tabela 1: Variáveis clínicas e FSFI na avaliação de 12 meses..... | 66 |
| Tabela 2: Comparação da microbiota vaginal na avaliação de 12 meses..... | 67 |
| Tabela 3: Avaliação das funções musculares do assoalho pélvico..... | 68 |
| Tabela 4: Questionários de qualidade de vida e da função pélvica | 69 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ACOG | American College of Obstetrics and Gynecologists |
| Cols. | Colaboradores |
| EBSERV | Empresa brasileira de serviços hospitalares |
| EFSMAP | exame das funções sensoriais e motoras do assoalho pélvico |
| FSFI | Female sexual function index |
| HC-UFMG | Hospital das Clínicas de Universidade Federal de Minas Gerais |
| HPV | Papiloma vírus humano |
| LGBN | Laboratório de genética e biologia molecular |
| NPDM-UFC | Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de medicamentos da Universidade federal do Ceará |
| NUPAD | Núcleo de ações e pesquisa em apoio diagnóstico |
| PFDI-20 | Inventário de estresse de assoalho pélvico |
| PFQI-7 | Questionário de impacto do assoalho pélvico |
| SF-12 | Short form healthy Survey |
| SOGIMIG | Sociedade de ginecologia e obstetrícia de minas gerais |
| TCLE | Termo de consentimento livre e informado |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução..... | 13 |
| 1.1. Agenesia vaginal..... | 13 |
| 1.2. Visão geral do tratamento da agenesia vaginal..... | 14 |
| 1.3 Dilatação vaginal..... | 15 |
| 1.4 Tratamento cirúrgico da agenesia vaginal..... | 15 |
| 1.5 O microbioma vaginal e a imunidade cervico vaginal..... | 17 |
| 1.6 Citologia..... | 20 |
| 1.7 Histologia..... | 21 |
| 1.8 Funções Motoras do Assoalho Pélvico..... | 24 |
| 1.9 Função Sexual..... | 25 |
| 1.10 Questionário de qualidade de vida..... | 25 |
| 1.11 Questionários de avaliação da função pélvica..... | 26 |
| 2. Justificativa do estudo..... | 27 |
| 3. Objetivos..... | 27 |
| 4. Metodologia..... | 27 |
| 4.1. Desenho do estudo..... | 30 |
| 4.2. Critérios de inclusão e exclusão..... | 30 |
| 4.3. Randomização..... | 31 |
| 4.4. Protocolo cirurgia..... | 31 |
| 4.5. Protocolo Dilatação vaginal..... | 37 |
| 4.6. Seguimento das pacientes..... | 38 |
| 4.7 Coletas das amostras, processamento, análise citopatológica, genotipagem HPV, detecção de biomarcadores..... | 40 |
| 4.8. Análise estatística..... | 44 |
| 5. Resultados..... | 45 |
| Referências..... | 74 |

1. Introdução

1.1. Agenesia vaginal

A agenesia vaginal é uma condição rara e está presente em 1 a cada 4000 recém-nascidos do sexo feminino. A síndrome de Mayer-Rokitanski-Küster-Hauser (MRKH) é responsável por 90% dos casos e se caracteriza pela ausência dos dois terços superiores da vagina e a não formação ou desenvolvimento incompleto do útero e das trompas(1). Até 53% dos pacientes com agenesia Mülleriana apresentam malformações congênitas concomitantes, especialmente do trato urinário (40%) e do sistema esquelético(2). As mulheres portadoras desta síndrome têm características sexuais secundárias feminina, cariótipo 46 XX e função ovariana normal(3).

Agenesia Mülleriana é causada por subdesenvolvimento embriológico do ducto mülleriano, com agenesia ou atresia da vagina, útero ou ambos. O canal vaginal é acentuadamente encurtado e pode aparecer como uma depressão abaixo da uretra. Um único remanescente uterino na linha média pode estar presente ou cornos uterinos (com ou sem cavidade endometrial) podem existir(4).

Os ovários, dada a sua origem embriológica diversa, são tipicamente de estrutura e função normais, embora possam ser encontrados em localizações atípicas.

A síndrome de Morris, também conhecida como síndrome de insensibilidade androgênica (AIS) ou feminização testicular, é uma condição genética rara que se caracteriza por um fenótipo feminino em indivíduos geneticamente masculinos. A síndrome de Morris é responsável por 7% a 8% dos casos restantes de agenesia vaginal (5) . Em pacientes com insensibilidade aos andrógenos, as gônadas são testículos, que produzem andrógenos normais, mas apresentam desenvolvimento feminino devido à aromatização periférica de testosterona em estrogênio. O não funcionamento dos receptores de androgênio resulta em diminuição ou ausência de pelos axilares. A vagina é normalmente encurtada e o útero ou colo do útero não se desenvolve devido a produção de substância inibidora mülleriana pelos testículos. Embora a incidência de insensibilidade aos andrógenos em mulheres é 1:20.000, pode ser tão alto quanto 1,1% em crianças do sexo

feminino com hérnias inguinais(5). O tratamento será o mesmo que o da síndrome de Rokitansky, exceto pela recomendação de avaliar as gônadas, dado o maior risco de desenvolver gonadoblastoma. A recomendação atual é esperar o fim da puberdade para considerar a gonadectomia, para que as características secundárias possam se desenvolver sem a necessidade de terapia de reposição hormonal (6).

A agenesia vaginal na grande maioria das vezes vai ser diagnosticada quando uma mulher jovem ou adolescente não menstrua (amenorreia primária) ou não consegue iniciar a vida sexual e é neste momento que a paciente procura ajuda.

1.2. Visão geral do tratamento da agenesia vaginal

Na abordagem da agenesia é fundamental o diagnóstico correto, que deve incluir um cariótipo, a busca por anomalias associadas, o aconselhamento psicológico e o tratamento das anomalias genitais na tentativa de se obter um canal vaginal funcional(7).

As questões psicológicas e emocionais da mulher com agenesia vaginal são complexas, inclusive no que se refere à sexualidade e ao futuro reprodutivo. Heller-Boersma *et al*, em 2009, observaram maiores índices de ansiedade fóbica, psicoticismo (alienação interpessoal), depressão e ansiedade quando comparadas com mulheres sem anomalias. Concluíram que a agenesia vaginal tem impacto negativo no estresse psicológico e na autoestima dessas mulheres (8).

O objetivo do tratamento é criar uma vagina com aparência e função o mais próximo do normal e com o uso de dilatadores. Deve ser indicado preferencialmente quando as pacientes estiverem preparadas para iniciar atividade sexual. Na presença de útero funcional, o tratamento cirúrgico incluirá a construção da vagina e sua comunicação como o colo uterino, a fim de evitar hematometra e permitir condições de fertilidade (9,10).

Embora alguns estudos definam o sucesso anatomicamente por um comprimento de 6 cm ou mais, a melhor definição de sucesso é uma vagina que seja funcional para atividade sexual confortável, conforme relatado pela paciente.

A primeira linha de tratamento é a dilatação progressiva, descrita pela primeira vez por Frank em 1938, que utiliza moldes vaginais com tamanho e espessura diferentes, colocados pela própria paciente. Esta técnica mostrou um índice de sucesso de 90%, com baixa morbidade(4).O tratamento cirúrgico é reservado para as pacientes que não obtiveram sucesso com a dilatação ou para aquelas que optam pela cirurgia como primeira opção.

1.3 Dilatação vaginal

Desde 2006, o ACOG (American College of Obstetrics and Gynecologists) recomenda que “A criação não cirúrgica da vagina é a abordagem de primeira linha apropriada na maioria dos pacientes”. Esta abordagem é baseada em uma taxa de sucesso maior que 90%, o que é semelhante à cirurgia, embora com inquestionavelmente menor morbidade e custos (6).

A dilatação deve ser precedida de uma orientação detalhada sobre anatomia e como utilizar o dilatador. A paciente deve ser instruída a colocar dilatadores progressivos no ápice vaginal distal por 10–30 minutos, uma a três vezes por dia(11). Existem muitas opções de dilatadores disponíveis e a paciente pode querer experimentar diferentes dilatadores ou vibradores para determinar quais são os mais confortáveis de usar.

O ideal é que as pacientes sejam vistas semanalmente ou quinzenalmente para monitorar o progresso, controlar efeitos adversos (incluindo dor e sangramento) e fornecer incentivo.

O envolvimento de um fisioterapeuta experiente do assoalho pélvico também pode ser benéfico(12).

1.4 Tratamento cirúrgico da agenesia vaginal

O tratamento cirúrgico pode ser realizado por meio de diversas técnicas que foram desenvolvidas nas últimas décadas, a saber: a técnica de Baldwin (segmentos intestinais); a técnica de Vechietti (tração vaginal); a técnica de Davydov (enxerto peritoneal); a técnica de Abbé-McIndoe (enxerto de pele); e a técnica de Abbé-McIndoe modificada (celulose oxidada). Todas as técnicas têm como objetivo principal possibilitar a mulher a relação sexual satisfatória com o mínimo de complicações (13)(14)

Não existe consenso na literatura sobre qual técnica cirúrgica é a melhor. Não há trabalhos randomizados comparativos com as diversas técnicas.

A técnica de Abe McIndoe tem sido uma das mais utilizadas e tradicionalmente utiliza um retalho de pele para cobrir o molde vaginal que é colocado em um túnel criado cirurgicamente entre a bexiga e o reto. Nos últimos anos a pele tem sido substituída por outros materiais como a tela de celulose oxidada ou a pele de tilápia, que evita cicatrizes extensas na pele da perna da paciente.

Pele de tilápia

As peles de tilápia são obtidas através da piscicultura do Castanhão (Jaguaribara-CE). Os peixes são cultivados em tanque de rede, com peso entre 800 e 1000 g. Eles são insensibilizados por choque térmico (caixas isotérmicas com gelo moído e água (1:1), para, em seguida, realizar-se a sangria. As peles são removidas com uma turquesa (ferramenta) e submetidas à lavagem com água corrente, para remoção de qualquer resquício de sangue e de outras impurezas. As peles são, então, transportadas ao laboratório do NPDM-UFC (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de medicamentos da Universidade federal do Ceará), onde são raspadas para retirada de restos de músculos, lavados em soro fisiológico estéril e congelados para armazenamento. Posteriormente, são descongeladas e incubadas em solução de detergente não iônico sob agitação vigorosa. Após lavagens em líquido estéril para retirada do detergente, a pele é incubada em solução de clorexidina para descontaminação e novamente lavada. As peles são congeladas a -80C por pelo menos 16h, liofilizadas até atingirem umidade satisfatória, embaladas a vácuo e irradiadas para esterilização completa.

As amostras de pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram cedidas pelo Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de medicamentos da Universidade federal do Ceará (NPDM-UFC) **de acordo com o termo de doação anexado**. O processamento, descontaminação e esterilização foram registrados no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com o número BR1020150214359.

Tela de celulose oxidada

O hemostático absorvível que é a celulose regenerada oxidada (Surgicel®) consiste numa malha de tecido, estéril, absorvível, preparada por oxidação controlada de celulose regenerada. O tecido é branco com um tom amarelo-claro; é resistente, podendo ser suturado ou cortado sem desfiar; é estável e deve ser armazenado em temperatura ambiente controlada. Pode ocorrer uma discreta descoloração com o tempo, que não influencia o desempenho do produto.

O mecanismo pelo qual o hemostático absorvível acelera a coagulação não é totalmente conhecido, mas parece consistir em um efeito físico e não em alterações da fisiologia normal de coagulação. Uma vez embebido em sangue, ele se expande e transforma-se em uma massa gelatinosa castanha ou preta que ajuda a formar um coágulo, atuando assim como adjuvante hemostático no controle da hemorragia local. Quando usado corretamente em quantidades mínimas, o hemostático absorvível Surgicel® é absorvido a partir dos locais de implantação sem praticamente nenhuma reação tecidual. A absorção varia de acordo com diversos fatores, incluindo a quantidade utilizada, o grau de saturação com sangue e o leito tecidual.

Além das suas propriedades hemostáticas locais, este hemostático absorvível é bactericida *in vitro* contra diversos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo aeróbios e anaeróbios.

A tela de celulose oxidada foi descrita como adjuvante hemostático útil em procedimentos ginecológicos como ooforectomia, histerectomia, conização do colo do útero e reparação de cistocele e retocele. E por isso tem sido também utilizada na neovaginoplastia.

1.5 O microbioma vaginal e a imunidade cervico vaginal

O microbioma vaginal é formado por uma comunidade dinâmica e complexa de microrganismos, os quais constituem a principal linha de defesa contra a colonização de patógenos oportunistas e são fundamentais para a manutenção da saúde da mulher.

Estudos científicos indicam que um microbioma dominado por espécies de *Lactobacillus* é o ideal para a saúde vaginal(15). Isso acontece devido principalmente a capacidade dessas bactérias em produzir compostos como

ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Essas substâncias acidificam o meio e assim, criam um ambiente favorável à saúde vaginal, contribuindo também para a defesa contra a colonização e proliferação de microrganismos patogênicos(16).

Existem evidências crescentes que a composição do microbioma vaginal influencia significativamente na saúde reprodutiva e sexual, incluindo os riscos relativos a abortos espontâneos e reações adversas no parto, além da defesa contra infecções, como infecções fúngicas, HIV e outros patógenos sexualmente transmissíveis. Sendo assim, conhecer o tipo de microbioma vaginal nos leva a uma melhor compreensão sobre o quadro clínico da mulher e direciona tratamentos de forma assertiva e eficiente de acordo com os microrganismos detectados(15).

O microbioma vaginal de mulheres em idade reprodutiva pode ser agrupado em seis tipos com base na composição das espécies presentes(16):

- Tipo I: predominância de *Lactobacillus crispatus*.
- Tipo II: predominância de *Lactobacillus gasseri*.
- Tipo III: predominância de *Lactobacillus iners*.
- Tipo IV: caracterizado por um conjunto diversificado de bactérias anaeróbicas e baixa proporção de *Lactobacillus*.
- Tipo V: predominância de *Lactobacillus jensenii*.
- Tipo *Bifidobacterium*: predominância de *Bifidobacterium*.

É importante lembrarmos que o tipo de microbioma vaginal não é estático e definido, podendo apresentar alterações devido diversos fatores, como: etnia feminina, período menstrual, desenvolvimento sexual, atividade sexual, idade, entre outros.

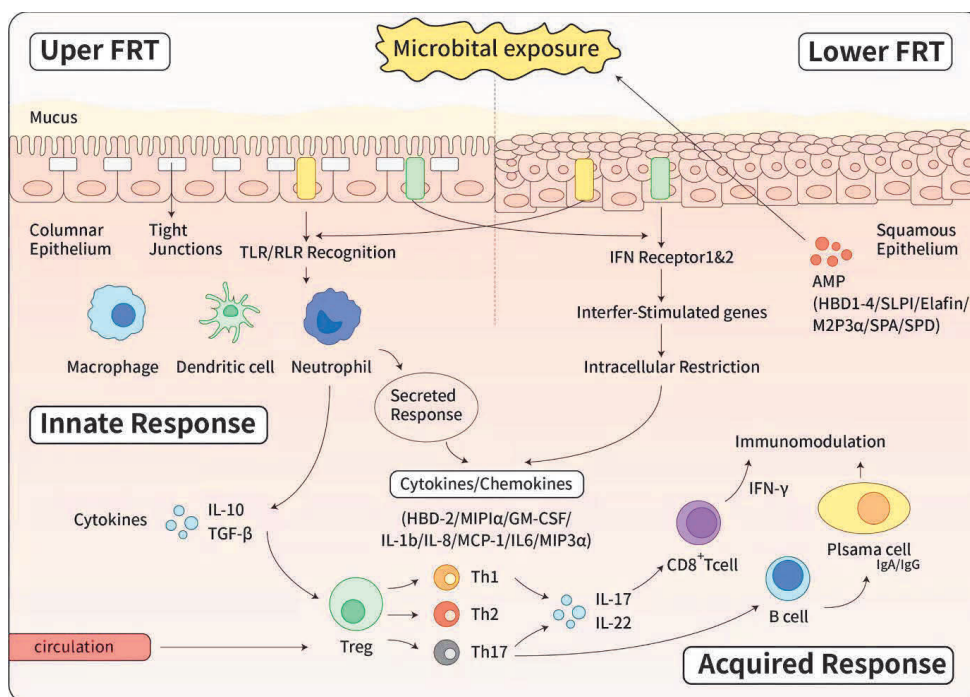
Além disso, o tipo de microbioma vaginal pode indicar se a comunidade bacteriana está mais suscetível ou não à invasão de patógenos. Na microbiota vaginal, um desequilíbrio da comunidade microbiana pode desencadear diversas condições, como a Vaginose Bacteriana, por exemplo.

A imunidade cervicovaginal é uma das principais linhas de defesa do organismo feminino contra patógenos virais, bacterianos, fúngicos e parasitários, seja por meio barreiras físicas, químicas, biológicas que constituem a imunidade inata, seja pelas redes de citocinas da imunidade adaptativa. Mais detalhadamente, os componentes celulares da imunidade

inata, como macrófagos e neutrófilos, atuam na fagocitose de microorganismos e na liberação de citocinas pró-inflamatórias. Proteínas antimicrobianas, como as defensinas e as catelicidinas, são expressas localmente e desempenham papel importante na neutralização de patógenos. A expressão diferencial desses marcadores é importante nos processos fisiológicos inflamatórios e na modulação da permeabilidade celular com a reestruturação de junções estreitas através de vias de sinalização celulares (17).

A imunidade adaptativa é mediada pela interação de células apresentadoras de antígenos (APCs), linfócitos T e B e produção de anticorpo (figura 1). Incluindo a resposta Th1 (mediada por células), Th2 (humoral), reguladora de T e Th17. Sabe-se que as células T do trato reprodutor feminino estão dispersas pelo estroma da vagina, colo do útero, abaixo do epitélio e no interior das células.

Figura 1: Imunidade vaginal, adaptado de Wang et al. 2022



Imunidade inata do trato reprodutivo feminino inferior, composto pela ectocérvice e vagina, é coberto por células epiteliais escamosas estratificadas. Abaixo da camada epitelial estão células imunes inatas e adaptativas. Quando o patógeno invade as células epiteliais, estas expressam um painel de receptores Toll-like (TLRs) e receptores RIG-like (RLRs) que podem reconhecer e responder a bactérias ou vírus. A resposta do interferon tipo I (IFN) é um

potente sistema de defesa nas células do trato reprodutivo feminino. Além disso, em resposta a patógenos, antimicrobianos e citocinas/quimiocinas são secretados para conferir proteção de amplo espectro.

Imunidade adaptativa utiliza por macrófagos da mucosa, células dendríticas e células epiteliais que apresentam antígenos diretamente às células T e B. A resposta humoral é mediada pela diferenciação das células B em plasmócitos que secretam anticorpos. Tanto a IgG quanto a IgA são produzidas no trato reprodutivo feminino e secretadas na mucosa.

Ainda não está claro se há diferença do microbioma e imunidade vaginal entre pacientes submetidas a neovaginoplastia ou dilatação progressiva, no tratamento da agenesia vaginal.

1.6 Citologia

A citologia vaginal é um exame diagnóstico que analisa células coletadas do epitélio vaginal e cervical para detectar alterações morfológicas que possam indicar doenças ginecológicas. É amplamente utilizada para rastrear câncer cervical e lesões pré-cancerosas, além de outras condições como infecções e distúrbios hormonais (18).

A citologia cervical tem sido o pilar do rastreio do cancro cervical desde meados do século XX. A sua terminologia evoluiu para refletir uma compreensão em evolução e melhora da patogênese da doença relacionada com o HPV no trato genital inferior. Em 1988, o primeiro workshop do *National Cancer Institute* (NCI) realizado em Bethesda, Maryland, resultou no desenvolvimento do Sistema Bethesda para relatórios citológicos. Esse método padronizado de relatórios de resultados de citologia facilitou a revisão por pares e a garantia de qualidade e foi atualizado e refinado no Sistema Bethesda III (19).

Estudos com neovaginas em mulheres transgênero indicam que a composição microbiana e os padrões citológicos diferem das vaginas cisgêneras, muitas vezes sendo mais semelhantes a um ambiente não dominado por *Lactobacillus*, o que pode influenciar os resultados citológicos. Além disso, o uso do Sistema Bethesda na avaliação citológica pode ter limitações para amostras de neovagina, devido a diferenças na estrutura e no tipo de células presentes. A citologia nesses casos pode ser usada para

monitorar infecções e condições inflamatórias, além de rastrear lesões associadas ao HPV, embora a aplicabilidade e a interpretação dos resultados precisem de critérios específicos para essas pacientes (20)

Nas pacientes com neovagina e embora a neoplasia intraepitelial vulvar e vaginal seja possível, os testes citológicos de rotina não são regularmente recomendados devido à ausência de um colo do útero (4)

Como em todas as pacientes sexualmente ativas, aquelas com neovagina devem ser orientadas e sobre a prevenção de infecções sexualmente transmissíveis e sobre a infecção pelo HPV e as doenças relacionadas ao HPV. A persistência de uma infecção de HPV de alto risco é considerada um fator de risco significativo para o desenvolvimento de câncer. A infecção por HPV foi documentada em cânceres de vagina, no entanto, existem algumas diferenças entre o câncer da vagina natural e o câncer da neovagina (21)

Além disso, como os programas de triagem do HPV foram projetados para a detecção precoce e prevenção do carcinoma cervical, não sabemos se os mesmos protocolos podem ser adequados para as pacientes de neovagina; no entanto, o acompanhamento dessas pacientes requer controles de resultados pós-operatórios, bem como avaliações de possíveis infecções ou doenças relacionadas ao HPV (21)

Pacientes com neovagina são suscetíveis ao desenvolvimento de carcinomas escamosos quando se utiliza enxertos cutâneos, ou adenocarcinomas em pacientes que reconstruíram a vagina a partir de alças intestinais. Deve-se investigar quais são as melhores estratégias de controle de HPV, câncer escamoso e adenocarcinoma neste tipo de paciente(22).

1.7 Histologia

Alguns estudos analisam a histologia da vagina após cirurgia de reconstrução. O objetivo é saber como fica a parede vaginal em relação a vagina da mulher sem esta patologia.

Barberini e cols relataram a biopsia de neovagina feita com retalho de pele da coxa. A microscopia de luz dos fragmentos demonstrou, mesmo dois anos após a cirurgia, características geralmente semelhantes às da derme e

epiderme normais, e uma taxa de queratinização como regra, que não variou significativamente da pele normal (23).

Alendrescu e cols realizaram biopsias em 12 pacientes utilizando uma técnica modificada de Abbe-McIndoe de vaginoplastia com enxerto de pele de espessura parcial. Todas as biópsias mostraram uma multiestratificação histológica normal do epitélio (24).

Motoyama e cols realizaram biopsia de vagina após cirúrgica de neovagina pela técnica de Abbe-McIndoe e utilizando tela de celulose oxidada para cobrir o molde vaginal inserido após a abertura do túnel vaginal. O epitélio escamoso era evidente, e estratificação gradual foi notada. Tecido de granulação foi observado sendo gradualmente coberto por epitélio escamoso. Epitélio escamoso estratificado normal que revestia completamente a cavidade vaginal era aparente em 2 meses após a operação. A secreção vaginal na neovagina foi menor em comparação com indivíduos normais e a formação de samambaias não pôde ser observada na neovagina. O pH foi sempre ácido em pacientes com neovagina em comparação com pacientes com vagina normal, em que o pH varia de ácido a básico, dependendo do ciclo. A flora vaginal revelou a presença de bastonetes gram-positivos e cocos para pacientes com síndrome RKH. Ao contrário da vagina adulta funcional normal, além dos organismos mencionados anteriormente, o bacilo de Doderlein não foi evidente (25).

Noguchi e colaboradores relatou um caso de vaginoplastia com a técnica de Wharton modificado usando derme artificial (esponja de atelocolágeno). Aos 50 dias após a operação, ocorreu epitelização completa. A biópsia da neovagina mostrou epitélio escamoso estratificado (26).

Panici e cols relataram o primeiro caso de transplante autólogo de tecido vaginal em uma mulher de 28 anos com MRKHS. A paciente foi submetida a uma biópsia de mucosa de espessura total de 1 cm² do vestíbulo vaginal. Após a dissociação enzimática, as células foram inoculadas em placas revestidas de colágeno IV e cultivadas por 2 semanas. A paciente foi submetida a uma vaginoplastia com uma vaginoplastia Abbe-McIndoe modificada com 314 cm² de tecido vaginal autólogo cultivado in vitro para o revestimento do canal. 1 mês após a cirurgia, a vagina parecia normal em comprimento e profundidade e uma biópsia vaginal revelou tecido vaginal normal (27).

Inagake e cols publicaram dois casos de neovagina utilizando tela de celulose. Estratificação gradual do epitélio escamoso foi notada 1 mês após a operação. Biópsia por punção da neovagina feita 2 meses após a operação revelou a evidência de epitélio escamoso estratificado. Não pareceu haver diferença aparente entre a neovagina e a vagina adulta normal (28)

Fedele e cols relataram sua experiência com trinta pacientes com síndrome de Rokitansky que foram submetidos à cirurgia laparoscópica de Davydov. Foram realizadas biópsias da mucosa neovaginal, que na microscopia óptica parecia muito semelhante em comparação com a vagina normal (ou seja, com espessura normal, estratificação escamosa normal e um epitélio rico em glicogênio) (29).

Dornelas e colaboradores publicaram os resultados de onze pacientes com agenesia vaginal que foram submetidas à vaginoplastia usando um molde envolto em celulose oxidada. A histologia das amostras foi avaliada para determinar a epitelização escamosa do tecido neovaginal ao longo do tempo, e o conteúdo total de colágeno das neovaginas foi comparado com indivíduos de controle normais. Os resultados da biópsia mostraram epitelização completa da neovagina após 5 meses em todas as amostras, e o conteúdo de colágeno foi comparável ao de uma vagina normal (30).

Crema e cols publicaram um estudo cujo objetivo foi avaliar os aspectos morfológicos pós-operatórios da neovaginoplastia pela técnica de McIndoe com o uso de membrana de celulose. Em todas as pacientes, lâmina própria rica em vasos sanguíneos e células epitelioides foi encontrada em um fragmento vaginal após 1 mês da neovaginoplastia. Epitélio vaginal típico também foi observado e a reação para identificação de glicogênio foi positiva 9 meses após a cirurgia em todos os casos (31).

Dias e cols em um estudo descritivo, propuseram a neovaginoplastia usando pele de peixe tilápia do Nilo a 3 pacientes. A análise microscópica dos fragmentos da parede vaginal lateral no grupo do dia 90 revelou tecido conjuntivo coberto por epitélio escamoso estratificado com cerca de 5 camadas de células. As análises histológicas e imuno-histoquímica revelaram a presença de epitélio escamoso estratificado com alta expressão de citoqueratinas e fator de crescimento de fibroblastos, correspondendo às características do tecido vaginal adulto normal (32).

Pavan e cols publicaram um caso de Vaginoplastia utilizando a técnica de McIndoe modificado usando xenoenxerto e um molde de impressora 3D personalizado. Após 7 meses, 8 cm de comprimento vaginal com 90% de epitelização foi alcançado. Uma biópsia vaginal foi feita, e os resultados histológicos mostraram um epitélio escamoso estratificado não ceratinizante (33).

Torres e cols publicaram uma série de onze casos de neovaginoplastia com pele de tilápia. A análise histológica e imuno-histoquímica demonstrou a formação de um epitélio escamoso estratificado com forte marcação para citoqueratinas, semelhante ao tecido vaginal adulto saudável (34).

1.8 Funções Motoras do Assoalho Pélvico

A avaliação da função do assoalho pélvico feminino envolve uma combinação de métodos clínicos, funcionais e de imagem para entender melhor a influência de funções musculares como tônus muscular, coordenação, força e resistência nas funções do assoalho pélvico tais como funções miccionais, defecatórias e sexual.

Para a avaliação das funções sensoriais e motoras do assoalho pélvico utilizamos o EFSMAP (Exame das Funções Sensoriais e Motoras do Assoalho Pélvico). Ele inclui uma lista de conceitos, instruções padronizadas e padrões de diagnóstico visados à reprodutibilidade da observação visual e palpação digital do assoalho pélvico (35).

O EFSMAP é o único instrumento de avaliação das funções musculares do AP que tem validade e confiabilidade testados, com índices adequados para serem usados tanto em pesquisas científicas quanto na clínica. Além disso, utiliza terminologia da CIF/OMS (classificação internacional de funcionalidade da organização mundial de saúde), favorecendo comunicação entre profissionais (36). Além de força e resistência, esta avaliação inclui o exame do tônus, reação muscular, controle e coordenação.

Para o nosso conhecimento não há avaliação do assoalho pélvico pelo EFSMAP ou por outro protocolo de avaliação fisioterápica publicado em estudos de tratamento de pacientes com neovagina. Tal avaliação é importante porque sintomas como dispareunia ou vaginismo podem tanto estar associados

às dimensões vaginais quanto à aumento de tônus e/ou deficiência de relaxamento muscular, por exemplo. Por outro lado, sensação de vagina frouxa ou perda de gases vaginais são sintomas que podem estar associados abaixo tônus e/ou deficiência de força e resistência musculares. Desta forma, deficiências em funções motoras do assoalho pélvico podem confundir resultados funcionais de mulheres com neovagina.

1.9 Função Sexual

O *Female Sexual Function Index* (FSFI) é uma escala breve para avaliar a função sexual em mulheres. A escala teve avaliação psicométrica, incluindo estudos de confiabilidade, validade de convergência e de discriminação. O FSFI é um teste escrito que tem seis subescalas e uma soma de escores que mede o grau de desejo, excitação, lubrificação, orgasmo, satisfação e dor (dispareunia) (37).

Os escores das subescalas são corrigidos e somados, originando um escore final. Os escores finais podem variar de 2 a 36. Escores mais altos indicam um grau melhor de função sexual e um escore maior que 26,55 é considerado uma função sexual adequada.

O “Female Sexual Function Index – FSFI” foi traduzido e validado para português (38).

O objetivo do tratamento das pacientes com agenesia vaginal é obter uma vagina com anatomia e função igual a das pacientes sem esta patologia e ter uma avaliação objetiva e subjetiva da função após neovagina é muito importante; por isso a escolha desse questionário para avaliação das pacientes desse estudo.

1.10 Questionário de qualidade de vida

O SF-12 (Short Form Health Survey - 12) é um questionário projetado para medir a qualidade de vida relacionada à saúde de maneira mais rápida e simples (39)

O SF-12 contém 12 itens, que são uma seleção reduzida dos 36 itens do SF-36. Esses itens permitem calcular os dois principais componentes da qualidade de vida: Componente Físico (PCS - Physical Component Summary) e Componente Mental (MCS - Mental Component Summary)

Os 12 itens abrangem 8 domínios:

1. Capacidade funcional
2. Aspectos físicos
3. Dor
4. Estado geral de saúde
5. Vitalidade
6. Aspectos sociais
7. Aspectos emocionais
8. Saúde mental

As respostas dos itens são transformadas em escores numéricos, que variam de 0 a 100. Os escores finais para PCS e MCS são calculados com base em pesos específicos atribuídos a cada item. Esses pesos foram derivados de análises estatísticas que relacionam os itens do SF-12 ao SF-36.

2. Interpretação dos Escores:

50 pontos: Representa a média da população geral saudável. Escores acima ou abaixo dessa média indicam melhor ou pior saúde, respectivamente.

Abaixo de 40 pontos: Geralmente indica problemas significativos de saúde física ou mental.

Acima de 60 pontos: Sugere excelente saúde física ou mental.

Assim como o SF-36, o SF-12 foi traduzido, adaptado e validado para o uso no Brasil (40). Ele é amplamente utilizado em pesquisas clínicas e epidemiológicas.

1.11 Questionários de avaliação da função pélvica

Disfunções do assoalho pélvico, como incontinência urinária (IU), incontinência fecal (IF) e prolapso de órgãos pélvicos (POP), podem ter um impacto significativo na qualidade de vida das mulheres e o uso de questionários que investiguem os sintomas são fundamentais.

Dois dos questionários mais frequentemente usados são o Questionário de Impacto do Assoalho Pélvico (PFIQ) e o Inventário de Angústia do Assoalho Pélvico (PFDI). Seu diferencial é que eles combinam sintomas de POP, IU e FI em uma única escala. Versões curtas — ou seja, PFDI-20 e PFIQ-7 foram desenvolvidas e validadas com seus formatos originais para encurtar o tempo

de aplicação e diminuir a carga dos entrevistados e foram validadas em vários idiomas. No Brasil a validação foi feita em 2016 (41).

2. Justificativa do estudo

Apesar de várias publicações sobre neovagina em mulheres com agenesia congênita de vagina, ainda há aspectos que precisam ser estudados e que interferem no resultado anatômico e funcional final dessa nova vagina. Há poucos dados na literatura em relação ao microbioma e, principalmente, sobre a função do assoalho pélvico neste grupo de pacientes, independentemente do tipo de tratamento realizado (cirúrgico ou dilatação vaginal).

3. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram investigar os efeitos do tratamento conservador ou cirúrgico de mulheres com agenesia de vagina na reposta imune vaginal, nas funções musculares do assoalho pélvico através do Exame das Funções Sensoriais e Motoras do Assoalho Pélvico (EFSMAP), nos sintomas de disfunções do assoalho pélvico, na função sexual e qualidade de vida, um ano após a intervenção.

4. Metodologia

Grupo de estudo:

A população deste estudo consiste em mulheres acima de 16 anos com diagnóstico clínico e por imagem de agenesia de vagina devido Síndrome de Rokitansky e de Morris, que desejaram serem submetidas ao tratamento para a criação de uma neovagina para iniciar atividade sexual. Em todas as pacientes foi realizado cariotipagem, ultrassonografia ou ressonância magnética de abdome e pelve e radiografia de coluna.

Recrutamento das pacientes

As pacientes com agenesia de vagina foram selecionadas no Ambulatório de Ginecologia do Hospital das Clínicas-UFMG no período de março de 2020 a maio de 2024. As pacientes foram convidadas a participar do estudo quando tiveram a indicação de tratamento para iniciar atividade sexual.

Várias estratégias para localizar as pacientes com agenesia vaginal do estado de Minas Gerais e em busca de tratamento foram utilizadas.

Um e-mail foi criado para facilitar a comunicação com as candidatas a tratamento e esclarecimento de dúvidas. Uma reunião foi realizada com a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais solicitando a divulgação dos códigos relacionados ao tratamento da agenesia vaginal em todo o estado. A professora Marilene realizou uma entrevista na rádio Itatiaia divulgando o projeto. O projeto foi divulgado no Instagram do Hospital das Clínicas. Também foi divulgado nos grupos de sociedades científicas de Minas e do Brasil.

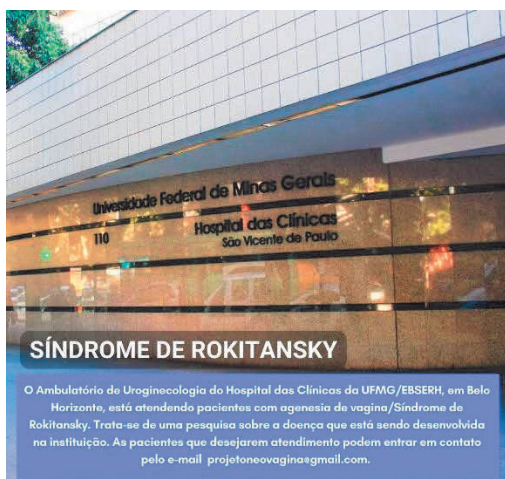
Fizemos uma reunião com o Instituto Roki, organização não governamental de São Paulo que busca acolher, informar e divulgar o tratamento da agenesia vaginal para o público em geral. Após esta reunião o instituto Roki nos ajudou a divulgar o projeto. Uma reportagem sobre o tema e o projeto foi publicado no boletim da EBSEH.



Entrevista para radio Itatiaia



Reportagem divulgando o projeto



UFMG EBSEERH



Boletim da EBSEERH

Instituto Roki



O Serviço de Uroginecologia do Hospital das Clínicas da UFMG está recrutando pacientes, com mais de 16 anos e diagnóstico de agenesia de vagina (**Síndrome de Mayer-Rokitansky**), para participarem de um estudo comparativo entre duas abordagens cirúrgicas de reconstrução vaginal.

As pacientes devem ter AIH cadastrada na Central de Internação de Belo Horizonte (CINT-BH). Na AIH devem constar os CIDs de **AGENESIA CONGÊNITA DE VAGINA (Q52, Q52, CID 10, Q52.8, Q52.9)** e procedimento 04.09.07.029-7 Tratamento cirúrgico da atresia de vagina. A CINT irá agendar consulta W para essas pacientes no serviço de Uroginecologia do HC-UFMG.

Para pacientes do interior, orientar a paciente a encaminhar a AIH para a secretaria de saúde do município de residência. A SMSA do município deve entrar em contato com o setor de TFD de Belo Horizonte para que seja feito o cadastro na CINT-BH.

Por favor, em caso de dúvidas ou orientações, entre em contato com:

Mucio Barata Diniz

- TEL.: 31 996179415

- EMAIL: mucioaratadiniz@gmail.com

Divulgação do projeto para os sócios da sociedade de ginecologia de Minas Gerais

Texto enviado a marcação de consulta e de internação

Boa tarde! O Serviço de Uroginecologia do Hospital das Clínicas da UFMG está recrutando pacientes, com mais de 16 anos e diagnóstico de agenesia de vagina (Síndrome de Mayer-Rokitansky), para participarem de um estudo comparativo entre duas abordagens cirúrgicas de reconstrução vaginal.

Solicitamos agendamento de pacientes com AIH cadastrada na Central de Internação de Belo Horizonte (CINT-BH), com os CIDs de **AGENESIA CONGÊNITA DE VAGINA (Q52, Q52, CID 10, Q52.8, Q52.9)** e procedimento 04.09.07.029-7 Tratamento cirúrgico da atresia de vagina. Já recebemos algumas pacientes nos últimos meses, mas ainda precisamos de mais algumas para conseguir concluir pesquisa.

Caso tenha algum caso ainda na CINT ou alguma paciente aguardando consulta CMC para ginecologia ou uroginecologia com esse diagnóstico, gostaríamos que fossem agendadas no ambulatório de uroginecologia do HC-UFMG, segundas-feiras, 07:30. Marcar 2 pacientes por dia, para Prof. Marilene Vale de Castro Monteiro.

No caso de pacientes agendadas como CMC, iremos fazer a AIH e encaminhar para autorização.

Agradeço desde já,
Att,

Orientações enviadas para a marcação de consultas de pacientes com agenesia vaginal

4.1. Desenho do estudo

Este foi um estudo observacional transversal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG sob o registro **CAAE: 33847220.2.0000.5149**.

4.2. Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão:

Mulheres com agenesia de vagina com indicação de tratamento e acima de 16 anos atendidas no ambulatório de Uroginecologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

Para as pacientes menores de 18 anos, a inclusão no estudo foi avaliada após entrevista juntamente com o responsável legal que recebiam as orientações sobre o diagnóstico, correção cirúrgica, complicações, seguimento pós-operatório, juntamente com a paciente.

Critérios de exclusão:

Alguma condição clínica ou degenerativa que seja contraindicação clínica para o procedimento cirúrgico ou de dilatação.

Não concordância em participar do estudo

4.3. Randomização

O projeto inicial tinha como objetivo a comparação entre duas modalidades diferentes de revestimento do molde vaginal para a cirurgia de neovagina. Uma utilizando a pele de tilápia do Nilo e outra utilizando a tela de celulose oxidada.

Naquele momento fizemos a randomização utilizando o aplicativo Randomizer planejando 20 pacientes para o projeto piloto. O aplicativo gerou 20 números aleatorizados para a randomização das pacientes. Cada número foi colocado num envelope pardo e lacrado.

Infelizmente não conseguimos recrutar as 20 pacientes durante 3 anos e discutimos o andamento do projeto. Com isto houve uma mudança para um projeto piloto comparando o microbioma, a histologia, a citologia, e a função do assoalho pélvico entre o grupo de pacientes operadas e o grupo de pacientes tratadas por dilatação vaginal que já haviam sido recrutadas até maio de 2024.

4.4. Protocolo cirurgia

Técnica de McIndoe

A primeira etapa da cirurgia consiste na preparação do molde recoberto com pele de tilápia ou tela de celulose oxidada. É necessário um molde de acrílico estéril adequado ao procedimento e com orifícios de fixação. Duas peles de tilápia de 10,0cm x 5,0cm são bem lavados com solução salina a 0,9% para remover o excesso glicerol em ambiente estéril intraoperatório. A pele é então anexada ao molde usando pontos separados com poligalactina multifilamentar 3.0 (Vicryl 3.0; Johnson & Johnson). O mesmo molde de acrílico será utilizado para colocação da malha de tela de celulose usando os mesmos pontos separados de poligalactina para sutura ao redor do molde.

O procedimento cirúrgico envolve apenas a abordagem vaginal e todas as suas etapas forma realizadas sob condições assépticas. As pacientes foram submetidas a raquianestesia e posicionadas em litotomia. Após o cateterismo uretral com sonda vesical de demora, foi identificado o introito vaginal e realizado uma incisão longitudinal na linha média de 3 cm. O espaço entre a bexiga e o reto foi dissecado progressivamente o mais alto possível, tendo cuidado para não entrar na cavidade peritoneal. Com base no princípio da dissecação romba, um canal foi criado entre a bexiga e o reto com a separação digital de tecidos. A cavidade recém-criada foi então inspecionada com a introdução de um espéculo vaginal. Nota-se se o canal está alinhado pelo tecido liso e a cúpula da cavidade formada por peritônio refletido de superfície superior da bexiga, e o aspecto anterior do reto. Hemostasia foi realizada com a ajuda da energia bipolar. A dissecação sem corte é continuada com o auxílio do espéculo, a fim de atingir as dimensões vaginais apropriadas (pelo menos 10 cm). A cavidade vaginal recém-criada deve ser capaz de acomodar facilmente o comprimento e a largura de dois dedos. Posteriormente, um molde vaginal acrílico (Stent Vaginal Ajustável) coberto com dois pedaços de pele de tilápia ou revestido por tela de celulose forma inseridos no canal e mantidos em posição por quatro suturas poligalactina multifilamentos 1.0 (Vicryl 1.0; Johnson & Johnson) entre a parte externa do molde e os grandes lábios para impedir a expulsão.

No pós-operatório as pacientes permaneceram em repouso no leito por um dia para garantir a imobilização do molde vaginal e permitir adequada absorção do material de revestimento, com sondagem vesical de demora com

sonda de Folley no14 e antibioticoterapia com metronidazol e cefalosporina de 1a geração venosa por 2 dias. A profilaxia de tromboembolismo foi feita com meia elástica e fisioterapia motora. Após 48 horas a sonda vesical foi retirada e após micção espontânea as pacientes receberam alta com orientações sobre a higienização externa de sua genitália. A primeira revisão pós-operatória foi realizada com sete a dez dias, retirado o molde e realizada limpeza do sítio cirúrgico com soro fisiológico a 0,9% instilado dentro da vagina. Os pacientes foram orientados quanto à manipulação diária dos moldes vaginais recobertos com preservativo, manutenção e limpeza do molde vaginal com água corrente e sabão.

Foto 1 : molde montado com pele de tilapia



Foto 2: Início da cirurgia, mostrando a incisão inicial

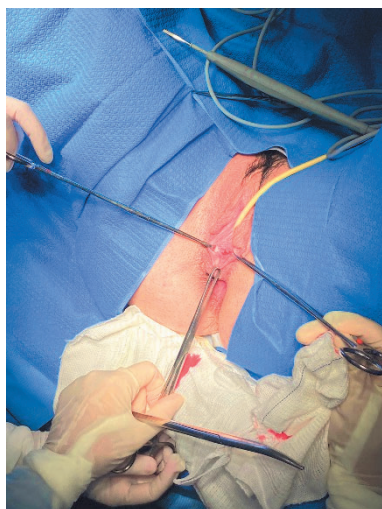


Foto 3: Preparação do tunel entre a bexiga e o reto

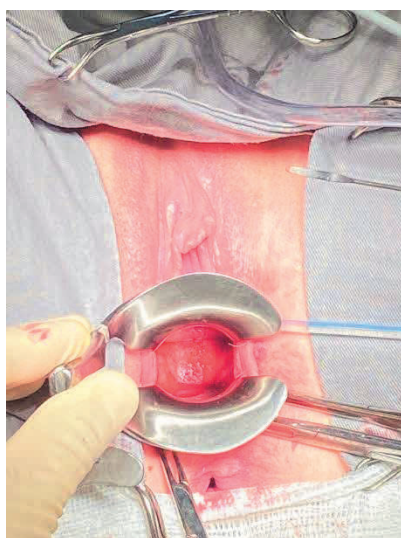


Foto 4: Pele de tilápia já tratada e prepara para cirurgia



Foto 5: Molde utilizado na cirurgia



Foto 6: Túnel entre a bexiga e o reto já criado e sendo ampliado pelo especulo

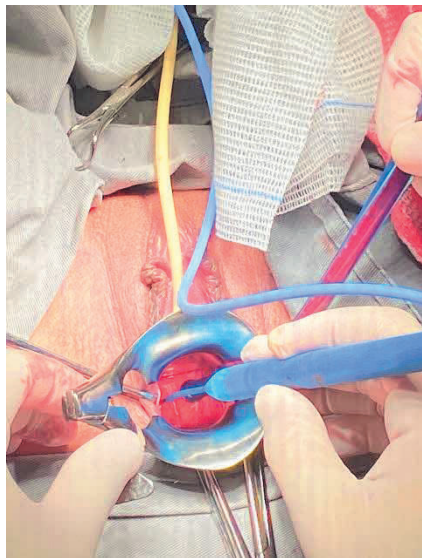


Foto 7: Molde vaginal colocado, pontos inseridos na vaginal para que o molde permaneça no local

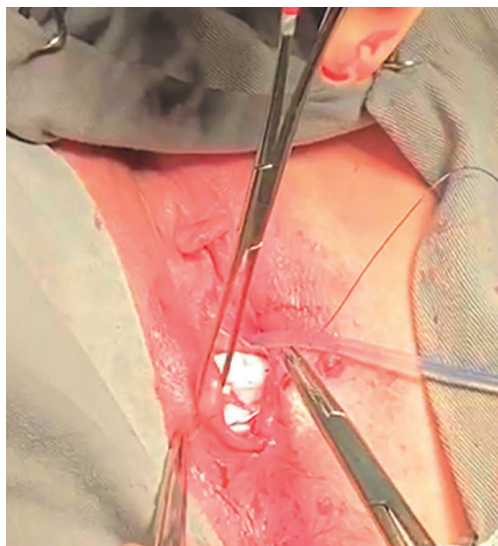
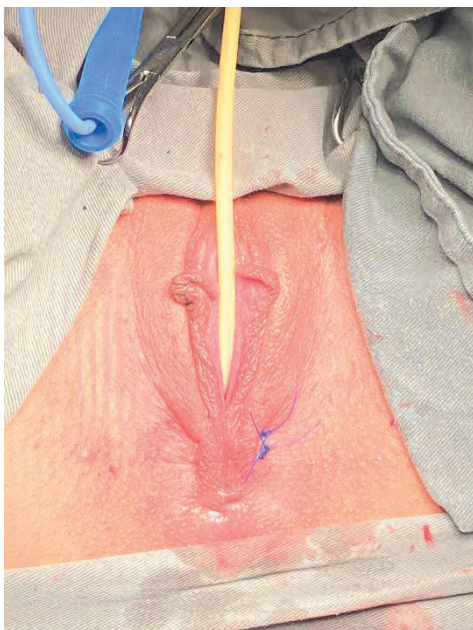


Foto 8: Aspecto pós-operatório final



4.5. Protocolo Dilatação vaginal

Após a avaliação completa da paciente com agenesia vaginal, orientamos sobre os dois tipos de tratamento. Quando a paciente optou pela dilatação vaginal progressiva utilizamos o seguinte protocolo:

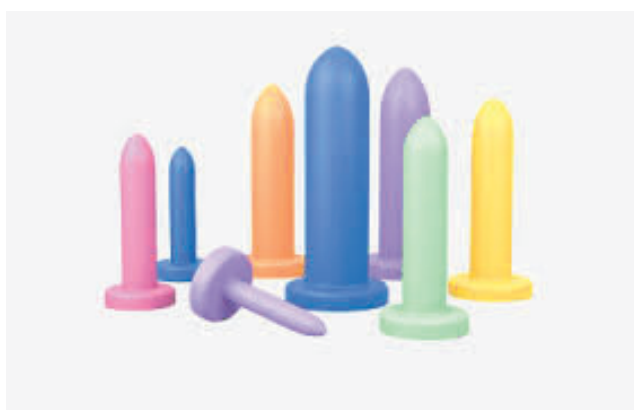
Primeira consulta: orientações sobre como fazer a dilatação, orientações psicoemocionais.

- Posição semissentada com os joelhos flexionados.
- Aplicar o menor molde vaginal gentilmente por 20 minutos, 3 vezes ao dia.
- À medida que houver evolução do tamanho da vagina, ir mudando para um molde maior.
- Reavaliação com 4 a 6 semanas.: Medida do comprimento e amplitude vaginal
- Reforçar os cuidados e o apoio psicoemocional

As reavaliações seguintes devem ser a cada 6 semanas até atingir o objetivo que seria um comprimento vaginal de pelo menos 6 cm ou a satisfação sexual.

Os pacientes que atingiram comprimento vaginal de pelo menos 5 cm, mas que não eram sexualmente ativas, mantinham um regime de manutenção da dilatação que consistia no maior dilatador alcançado, 2 ou 3 vezes por semana.

Foto 8: Dilatadores vaginais



4.6. Seguimento das pacientes

O acompanhamento ambulatorial das pacientes que se submeteram ao tratamento cirúrgico foi com retorno em 7 a 10 dias, mensal até seis meses do pós-operatório, e depois anual a partir de então com seguimento total de pelo menos 2 anos. As pacientes foram orientadas a usar molde de silicone em tempo integral, retirando apenas para defecar durante 2 meses. Após o terceiro mês, o molde foi prescrito para uso somente à noite.

Atividade sexual só foi liberada depois de constatada a epitelização vaginal e nunca antes de três meses da cirurgia.

Durante o seguimento clínico avaliamos o comprimento vaginal (vaginometria utilizando histerômetro); epitelização do canal pelo exame especular e da amplitude vaginal pelo toque bi digital. O sucesso anatômico foi definido neste estudo por neovagina maior que seis centímetros de

comprimento e que permita a introdução confortável de dois dedos do examinador após seis meses de cirurgia ou que tenham conseguido relações sexuais satisfatórias.

Os resultados funcionais foram avaliados pela aplicação do questionário *Female Sexual Function Index* (FSFI) após início da atividade sexual.

Foi avaliada a microflora da neovagina através de cultura para bactérias aeróbias e anaeróbias, Ph e citologia líquida colhida no pós-operatório aos 12 meses

O exame das funções sensoriais e musculares do Assolho pélvico foi realizado com 12 de pós-operatório por Fisioterapeuta experiente em Saúde da Mulher e seguiu o seguinte roteiro:

Para as pacientes no protocolo de dilatação, optamos por seguimento mensal e a seguir trimestral. Aos 12 meses de seguimento, fizemos uma biópsia da parede vaginal, coletamos citologia em meio líquido e analisamos o microbioma vaginal. Além disto neste mesmo momento foram aplicados o EFSMAP e os questionários PFDI, PFIQ-7 e SF-12.

Para a análise histopatológica no grupo da cirurgia realizamos biópsia da parede vaginal aos 12 meses nos dois grupos de tratamento. O local para biópsia foi o terço superior da parede vaginal lateral direita. Os fragmentos de tecido mole foram imersos em 10% de formalina tamponada neutra por 48 h; eles foram então lavados em água corrente e analisados macroscopicamente para alterações de forma, cor e consistência. Os fragmentos foram então colocados em cassetes e processados por um processador de tecidos Leica automatizado. Eles foram imersos em um banho contendo parafina, resultando na formação de blocos em forma de parafina em temperatura ambiente. Finalmente, os fragmentos foram seccionados em série para uma espessura de 4 mm e submetidos à coloração de rotina usando hematoxilina e eosina. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e analisadas em um microscópio de luz padrão.

4.7 Coletas das amostras, processamento, análise citopatológica, genotipagem HPV, detecção de biomarcadores

Coleta das amostras em citologia em meio líquido

Durante o exame ginecológico as amostras vaginais foram coletadas e células epiteliais e fluidos foram obtidos com o auxílio de dispositivos de amostragem (espátula de Ayre ou cito-escova) e transferidos para dois tubos. A primeira amostra (Tubo 1), juntamente com o dispositivo de amostragem, foi transferida imediatamente para um tubo de polipropileno com 4 ml de solução salina suplementada com 3% de soro fetal bovino (SFB), 3% do antibiótico (ATB) penicilina/ estreptomicina e 2% de heparina sódica (HS). A segunda amostra (Tubo 2) foi transferida para um frasco contendo conservante a base de etanol (ClearPrep®). As amostras da cérvix uterina foram mantidas em gelo e devidamente destinados aos laboratórios para subsequente processamento e análise.

Processamento das amostras biológicas em meio ClearPrep®

No Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM), integrante do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG, procedeu-se à abertura do tubo de coleta 2 de cada paciente em uma cabine de segurança biológica, visando assegurar condições estéreis e minimizar riscos de contaminação. Adiante, com o auxílio de uma pinça estéril, o dispositivo de amostragem foi cuidadosamente suspenso e submetido a um processo de lavagem repetido por 10 vezes com aspiração e dispensa da suspensão contida no próprio frasco. Na sequência o dispositivo de amostragem foi descartado e o líquido residual foi subdividido para fins de análise citopatológica e molecular. O volume de 1mL foi inicialmente transferido para uma solução conservante de álcool tamponado, a fim de preservar a integridade das células presentes na amostra. Em seguida, todo o volume restante foi transferido para a solução citológica 1 ClearPrep® (RESOLUTION BIOMEDICAL, 2015), cuja função é facilitar a obtenção de uma monocamada celular e promover a adesão das células à superfície de lâminas citológicas. As amostras foram então submetidas a centrifugação a 1.500 rpm por um período de 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi

descartado em recipiente apropriado para resíduos biológicos, enquanto o pellet formado no fundo do tubo foi avaliado visualmente para determinação do volume necessário da solução citológica 2 ClearPrep® (RESOLUTION BIOMEDICAL, 2015).

Após a adição da solução citológica 2 ClearPrep®, as amostras foram vortexadas por 20 segundos. Para homogeneizar as amostras, os tubos foram tampados e gentilmente vertidos. Na sequência, com uma pipeta Pasteur, a amostra foi aspirada e cerca de 4 gotas foram depositadas no centro da lâmina citológica para posterior coloração.

Análise citopatológica

No Laboratório de Patologia Molecular, integrado ao Departamento de Anatomia Patológica Médica (APM) da Faculdade de Medicina da UFMG, procedeu-se à coloração das lâminas pelo método de Papanicolaou. Após a conclusão do processo de coloração, realizou-se a montagem das lâminas, aplicando-se uma gota de Entellan® no centro de cada uma delas. Em seguida, com o auxílio de uma pinça, uma lamínula previamente limpa foi cuidadosamente posicionada sobre o Entellan®, pressionando-se levemente para garantir a adesão uniforme e a eliminação de bolhas de ar. As lâminas foram então deixadas para secar à TA. O exame e diagnóstico citopatológico das amostras cervicais das participantes foram conduzidos por um patologista experiente do APM/UFMG, seguindo protocolos padronizados e critérios técnicos estabelecidos. Após a análise microscópica, as amostras foram classificadas de acordo com as diretrizes do Sistema Bethesda (2014).

Detecção e genotipagem do HR-HPV

Com o objetivo de determinar os HR-HPV presentes nas amostras, foi realizada a genotipagem dos subtipos virais infectantes no LGBM/NUPAD da Faculdade de Medicina da UFMG. Para isso, foi utilizado o kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, a primeira etapa consistiu na agitação dos frascos que continham micropartículas, seguida da adição de 25 µL das micropartículas em

microtubos estéreis de 1,5 ml previamente identificados. Na sequência, foram acrescentados 400 µL de solução de lise em cada microtubo. Após, 400 µL das amostras cervicais e dos controles foram adicionados separadamente aos microtubos contendo as micropartículas e a solução de lise, seguido de homogeneização por 5 vezes com auxílio de pipeta. Os microtubos foram colocados em um termobloco seco a 56°C por 10 min, em seguida foram transferidos para uma estante (rack) magnética por 2 min. Os sobrenadantes foram aspirados com cautela e descartados. Após este processo, os microtubos foram realocados para estantes comuns (não magnéticas). Para realizar a lavagem das amostras, foram adicionados 800 µL de Wash Buffer I seguido de homogeneização com auxílio de pipeta. Os microtubos foram novamente inseridos em uma estante magnética por 1 min, os sobrenadantes foram aspirados e descartados e os tubos transferidos para uma raque não magnética. Posteriormente, foram adicionados 800 µL de Wash Buffer II às amostras, seguido de homogeneização com auxílio de pipeta. Houve novamente a transferência dos microtubos para a estante magnética por 1 min, aspiração, descarte do sobrenadante e realocação para estante comum. A lavagem com Wash Buffer II foi repetida. Por fim, o processo de eluição teve início com adição de 100 µL do Elution Buffer diretamente sobre as micropartículas e homogeneização com pipeta. Os tubos foram transferidos para o termobloco a 75°C por 10 min e colocados em uma estante magnética por 1 min. O sobrenadante contendo o material genético de interesse foi transferido para tubo cônico de polipropileno de 2 ml previamente rotulado para a qPCR e sequenciamento bacteriano.

A amplificação do DNA viral foi realizada no LGBM/NUPAD da Faculdade de Medicina da UFMG. Para tal finalidade, empregou-se o teste multiplex automatizado do kit *Abbott RealTime High Risk* (HR) HPV, o qual tem como alvo a região L1 (GP5+/6+) de 14 subtipos de HPV de alto risco (HR-HPV). O kit utiliza quatro marcadores fluorescentes distintos, permitindo a detecção e genotipagem específica dos HR-HPV 16 e 18 por meio de sondas individuais, bem como a identificação de um pool composto por outros 12 subtipos de HR-HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) em uma única sonda (Hesselink et al., 2013). De acordo com as especificações do

fabricante, os reagentes do kit de amplificação foram inicialmente submetidos a vortexação por 30 segundos para garantir homogeneização. Em seguida, 278 μ L do reagente 1 (DNA polimerase) foram transferidos para o frasco contendo o reagente 3 (Reagente de Ativação), procedendo-se à homogeneização manual com pipeta por seis vezes. Paralelamente, adicionou-se 420 μ L do reagente 2 (Reagente de Oligonucleotídeo) ao mesmo frasco do reagente 3, seguido de nova homogeneização manual com pipeta, também por seis vezes. Posteriormente, uma placa óptica de reação com 96 poços foi posicionada em suporte específico. Transferiu-se, então, 25 μ L da mistura preparada no frasco 3 para cada poço da placa. Imediatamente após, adicionaram-se 25 μ L de cada amostra de DNA extraída, bem como dos controles positivos e negativos, nos respectivos poços da placa, seguindo-se homogeneização manual por cinco vezes. Finalmente, as placas foram seladas com filme óptico, centrifugadas a 1.500 rpm, a 22°C, por 1 minuto, e inseridas no termociclador m2000 RealTime para processamento automático e subsequente leitura dos resultados.

Deteccção de biomarcadores imunológicos no líquido cervicovaginal

A fim de determinar os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, foram utilizadas amostras do fluido cervical previamente colhidas e mantidas em um freezers a -80°C, imersas em solução salina (Tubo 1). A quantificação desses biomarcadores foi conduzida por meio do kit “Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex” (Bio-Rad Laboratories), que emprega 27 esferas magnéticas, cada uma dotada de intensidade e fluorescência únicas e distintas, revestidas com anticorpos específicos capazes de reconhecer citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento humano. Esse método permitiu a avaliação simultânea de 27 biomarcadores em um único ensaio (Citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70, IFN- γ , IL-15 e IL-17; Citocinas reguladoras: IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13; Quimiocinas: CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10; Fatores de crescimento: FGF-basic, PDGF-BB, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7), utilizando pequenos volumes de amostras. Em síntese, os fluídos cervicais foram delicadamente descongelados e homogeneizados, sendo então transferidos, em alíquotas de 300 μ L, para microtubos. Em seguida, foram submetidos a uma centrifugação a

1.400 rpm, a 18°C, por um período de cinco minutos. Após essa etapa, 90 µL do sobrenadante foram cuidadosamente transferidos para placas de fundo chato, que já continham 50 µL dos padrões de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento humano, diluídos de forma seriada com o diluente Assay Buffer (um reagente integrante do kit Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex). Adicionalmente, foram acrescentados 50 µL dos controles de qualidade 1 e 2, bem como 50 µL do diluente Assay Buffer (Background), para garantir a confiabilidade dos resultados. Por fim, a cada poço da placa, foram introduzidos 25 µL da mistura de esferas magnéticas conjugadas aos anticorpos monoclonal/ais, selando assim a preparação para as etapas subsequentes de análise.

As placas, devidamente seladas, foram submetidas a uma incubação por 18 horas, a 4°C sob agitação de 500±50 rpm. Findo esse período, as placas passaram por um processo de lavagem com 200 µL de Wash buffer 1x empregando o suporte magnético. Em seguida, 25 µL de anticorpo de detecção foram adicionados a cada poço, e após uma hora de incubação, outros 25 µL de reagente de revelação (estreptavidina conjugada ao fluorocromo ficoeritrina-PE), a cada poço. Após uma nova incubação de 30 minutos, as placas foram novamente lavadas com 200 µL de Wash buffer 1x. Na sequência houve adição de 150 µL do reagente Sheath fluid e subsequente leitura das amostras no equipamento Bio Plex 200, conforme recomendações do fabricante. A Análise dos dados foram obtidas através do software Bio-Plex Manager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Todo o processo de aquisição e análise dos dados foi realizado na Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto René Rachou - IRR – FIOCRUZ/ Minas.

4.8. Análise estatística

A análise de dados da imunidade vaginal foi realizada na Plataforma de Citometria de Fluxo. Para comparação entre os grupos em relação ao perfil de expressão dos biomarcadores, status de HPV, diagnóstico citopatológico e perfil da microbiota, foram aplicados teste Z, o teste de Qui-quadrado, a correlação linear de Spearman [para dados não paramétricos] e a correlação

de Pearson [para dados paramétricos]. Essas análises foram realizadas por meio dos softwares PRISM 8, MINITAB 17, MATLAB e do Bio-Plex Manager [Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA]. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05.

Para as variáveis categóricas foram apresentados os valores de frequência e proporção, e para as variáveis contínuas os valores de média e desvio padrão. Para investigar a associação entre os grupos e variáveis categóricas utilizou-se o teste de Qui-Quadrado; e na comparação da mediana entre os grupos utilizou-se o teste de Mann Whitney. Na comparação antes e depois do tratamento o teste de Wilcoxon para amostras pareadas foi aplicado. As análises foram realizadas no software Stata versão 17.

5. Resultados

Os resultados encontrados são demonstrados em formato de artigo científico a ser enviado para publicação.

IMMUNE RESPONSE AND PELVIC FLOOR FUNCTION AFTER NEOVAGINOPLASTY VERSUS DILATION IN WOMEN WITH VAGINAL AGENESIS

Diniz MB¹: data collection, manuscript writing

Godoy MR¹: data collection

Viglioni IEP³: data collection

Figueiredo EM²: manuscript review

Xavier MAP³: manuscript review, data analysis

Monteiro MVC¹: manuscript review, data analysis

- 1- Department of Gynecology and Obstetrics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
- 2- Rehabilitation Sciences Program, Federal University of Minas Gerais, Brazil. [UFMG], Belo Horizonte, MG, Brazil

3- Department of Pathological Anatomy and Legal Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG,

Correspondence:

Marilene V C Monteiro.

Alfredo Balena avenue, 190, room 211, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil zip code 30130-100. Email : marilene.vale@gmail.com +55 31 34099764

Financial Disclaimers/Conflict of Interest: None

Author contributions:

Word counts

Abstract: 249 words

Main text: 2875 words

Abstract

Introduction and Hypothesis: The effects of surgical and non-surgical treatments on the immune response and pelvic floor muscle function in women with vaginal agenesis were investigated. We hypothesized that the immune response and pelvic floor function would differ significantly between treatment groups after 12 months.

Methods: Patients with vaginal agenesis treated at our hospital between March 2020 and May 2024 were enrolled in this cross-sectional observational study. Participants selected neovaginoplasty [Group 1] or progressive vaginal dilation [Group 2]. Vaginal immunity and pelvic floor function were assessed after 12 months.

Results: Eleven women with vaginal agenesis participated in the study: six in the surgical group [Group 1] and five in the dilation group [Group 2]. Ten women presented with the 46,XX karyotype and one with the 46,XY karyotype. The final mean vaginal length was 8 cm in group 1 and 5 cm in group 2 [$p= 0.004$]; ten participants reported being sexually active and satisfied with their sex-life after 12 months. Two patients in each group tested positive for high-risk HPV-DNA. The vaginal microbiome showed a predominance of lactobacillus flora in patients in Group 2 and a predominance of non-lactobacillus flora in patients in Group 1. The groups had similar levels of the immunological biomarkers evaluated at 12 months. Pelvic floor muscle function did not differ significantly between groups.

Conclusions: The surgical and dilation groups showed similar local immune response and pelvic floor function after 12 months. EFSMAP [Examination of

Pelvic Floor Sensory and Motor Functions] was applicable for functional assessment of these patients. Further research is needed to determine the HPV screening recommendations for this population.

Keywords: neovaginoplasty, pelvic floor, Rokitansky syndrome, vaginal agenesis, vaginal immunity

Brief summary [24/25 words]

Effects of neovaginoplasty and dilation treatments on immune response and pelvic floor muscle function in women with vaginal agenesis were compared 12 months post-intervention.

Introduction

Vaginal agenesis is a rare condition, occurring in 1/4,000 female newborns. Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser [MRKH] syndrome accounts for 90% of cases, while Morris syndrome accounts for 7–8% [1][2]. The first-line approach to the condition is progressive dilation using vaginal molds of different sizes and thicknesses, inserted by the patient. Neovaginoplasty is indicated for patients who have not had success with dilation or who want surgery [1][3]. The aim of treatment is to provide a functional vagina for satisfactory sexual function and improved quality of life.

Surgery may be performed using various techniques [4][5]. The Abbe–McIndoe technique is one of the most commonly used methods; it traditionally uses a skin graft to cover a vaginal mold, which is placed in a surgically created tunnel between the bladder and the rectum. Skin grafts have recently been replaced by other materials, such as oxidized cellulose mesh or tilapia skin, which help avoid extensive scarring of the patient's thigh [6,7].

Despite the publication of several studies on the treatment of congenital vaginal agenesis, there are still aspects that interfere with the final anatomical and functional result of the new vagina and that require further research. Little data is available in the literature regarding the vaginal immune response and especially on the pelvic floor function in this group of patients, regardless of the treatment method [neovaginoplasty or vaginal dilation].

Vaginal immunity is one of the female body's lines of defense against viral, bacterial, fungal, and parasitic pathogens, either through physical, chemical, and biological barriers that constitute innate immunity or through the

cytokine networks of adaptive immunity [8][9]. Whether the neovagina microbiome presents the same cytokine network and protective mechanisms, or whether the risk of human papillomavirus [HPV] infection is equivalent to that of women without agenesis, remains unclear [10].

The pelvic floor [PF] muscles contribute to the support of the pelvic organs and the closure of the urethra, anus, and vagina; thus, they may influence the vaginal and sexual function of women [11]. If they present high muscle tone or poor present low muscle tone, weak contraction, and reduced muscle strength, they can lead to vaginal laxity and reduced sensation during vaginal penetration [9]. Therefore, pelvic floor muscle function may act as a confounding factor in the functional outcomes of the neovagina.[12]

In this study we aimed to investigate the effects of conservative and surgical treatment in women with vaginal agenesis on vaginal immune response, pelvic floor muscle function, symptoms of pelvic floor dysfunction, sexual function, and quality of life, 1 year after the intervention.

Materials and Methods

A cross-sectional observational study was conducted on patients with vaginal agenesis who were treated at our hospital between March 2020 and December 2024. Patients who refused to participate in the study were excluded. After receiving guidance, patients chose either mechanical dilation or surgical treatment and signed the informed consent form. Because vaginal agenesis is a rare condition, it was not possible to perform a sample size calculation, and a

convenience sample was used instead. The study was approved by the Research Ethics Committee of our hospital [CAEE: 33647220200005149].

Participants who opted for surgery underwent the Abe–McIndoe technique in which tilapia skin or oxidized cellulose mesh is used to cover the new vaginal canal [7,13]. The procedure involves a vaginal approach; the patient is placed under spinal anesthesia and in the lithotomy position. Once the vaginal introitus has been identified, a 3 cm longitudinal incision is made along the midline. The space between the bladder and rectum is progressively dissected and a canal of at least 10 cm is created between the bladder and rectum. After hemostasis, a 10 cm long cylindrical acrylic vaginal mold, covered with tilapia skin or oxidized cellulose mesh is inserted into the canal and held in this position by sutures between the external part of the mold and the labia majora to prevent expulsion. The choice between tilapia skin or oxidized cellulose mesh was made randomly [see Appendix 1]. Patients were discharged 48 h after surgery with the acrylic vaginal mold in place; they returned after 7 days for its removal. They then began daily use of a size 5 nontoxic polyvinyl chloride [PVC] mold [see Appendix 2], which they removed once a day for cleaning, and continued this routine for 3 months.

Patients who opted for progressive vaginal dilation [Group 2] were instructed on how to insert and manipulate the dilator using the following protocol: [1] In a semi-sitting position with knees bent, apply silicone vaginal mold number 1 for 20 min, three times a day; [2] as dilation progresses, move on to a larger mold until reaching mold number 5. The molds are made of non-toxic polyvinyl chloride [PVC], by Absoloo®.

All participants were monitored monthly via outpatient visits for 6 months post-intervention, and then at 12 months. At each visit, the dilator use protocol was reviewed, vaginal length was measured, and the vaginal epithelium was assessed. In Group 1, sexual activity was allowed only 3 months after surgery. Patients in Group 2 were allowed to engage in sexual activity from the start of dilation. In this study, a good anatomical result was defined as the creation of a neovagina at least 6 cm long and that allowed the examiner to insert two fingers. Sexual function was assessed using the Female Sexual Function Index [FSFI] after patients began sexual activity [14,15].

After 12 months of follow-up, outcomes related to vaginal immunity and pelvic floor muscle function were evaluated.

For the vaginal immunity outcome, the neovagina's microflora was evaluated through aerobic and anaerobic bacterial cultures, vaginal cytopathology [Pap smear: normal or abnormal], HPV testing [positive or negative], microbiota profile [*Lactobacillus* and non-*Lactobacillus* dominated microbiota], immunoproteome analysis [pro- and anti-inflammatory cytokines, chemokines, and growth factors], and vaginal pH measurement using a pH-Fix 0–14® pH indicator strip. Histopathological examination of a biopsy fragment from the vaginal wall was also performed and the expression profile of 27 vaginal immunity biomarkers was analyzed in a single assay [see Appendix 2].

For the pelvic floor muscle function outcome, the Pelvic Floor Sensory and Muscle Function Examination [EFSMAP] was used [16]. Vaginal length was measured using a graduated ruler in centimeters. Symptoms of pelvic floor dysfunction were assessed using the Pelvic Floor Distress Inventory

Questionnaire [PFDI] and the Pelvic Floor Impact Questionnaire [PFIQ-7] . The Short-Form Health Survey [SF-12] was used to assess quality of life [17].

Vaginal immunity data was evaluated using the Flow Cytometry platform. The Z test, Chi-square test, Spearman's rank correlation [for nonparametric data], and Pearson's correlation [for parametric data] were used to compare the groups in terms of their biomarker expression profiles, HPV status, cytopathological diagnosis, and microbiota profiles. These analyses were carried out using PRISM 8, MINITAB 17, MATLAB, and Bio-Plex Manager software [Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA]. Significance was set at $p < 0.05$.

Categorical variables were presented as frequencies and proportions, and continuous variables as mean and standard deviation [SD] values. The Chi-square test was used to examine associations between the groups and categorical variables. The medians of the two groups were compared using the Mann–Whitney test and pre- and post-treatment differences were assessed using the Wilcoxon signed-rank test.

Results

Thirteen participants with vaginal agenesis were recruited: six patients opted for surgery [Group 1], five for the dilation approach [Group 2], and two declined to participate in the study [Figure 1]. Among the surgical group, three had a neovagina created using oxidized cellulose mesh and three using tilapia mesh. The ages of the participants ranged from 17–51 years [mean: 26.3]. Of these participants, 10 presented with a 46,XX karyotype [Rokitansky syndrome] and one with a 46,XY karyotype [Morris syndrome]. Imaging exams revealed

the absence of a uterus and vagina in nine participants; two had a rudimentary uterus, and all presented with female secondary sexual characteristics. As their main complaint, nine patients reported the inability to have sexual intercourse, and two sought care to evaluate primary amenorrhea; the initial vaginal length ranged from 0.3–3 cm.

Table 1 presents the clinical outcomes at the 12-month follow-up. Vaginal length and pH differed significantly between the groups [$p = 0.004$]. All participants achieved enough vaginal width to allow for the insertion of two fingers. Ten participants were sexually active after the intervention and reported satisfaction, as indicated using the FSFI.

The cytopathological examination was positive in one patient from Group 1 [high-grade squamous intraepithelial lesion [HSIL]] and in two patients from Group 2 [atypical squamous cells of undetermined significance [ASC-US]]. High-risk HPV-DNA testing was positive in two patients from Group 1 and two from Group 2. Only one participant in Group 1 had matching positive results for the cytopathological examination and HPV-DNA test. In Group 2, one participant had discordant results, with positive results for high-risk HPV-DNA but a negative cytopathological examination result.

Evaluation of the vaginal microbiome confirmed a predominance of lactobacillary flora in participants in Group 2 [80%] and a predominance of non-lactobacillary flora in participants in Group 1 [83.33%], with significance [$p = 0.036$] [Table 2].

The histopathological analysis results of the vaginal wall biopsies show that most participants in Group 2 [80%] had squamous epithelium in multiple

sections. Conversely, samples from Group 1 lacked stratified squamous epithelium; this difference between the groups was statistically significant [$p = 0.002$]. Both groups' samples predominantly showed inflammation, characterized by inflammatory infiltrate and a degree of vascularization. Granulation tissue formation was observed in samples from Group 1, but not in those from Group 2 [$p = 0.000$].

Quantification of cellular immunity biomarkers was carried out using the Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex kit [Bio-Rad Laboratories], which measures 27 biomarkers divided into the following groups: chemokines [CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10]; growth factors [FGF-basic, PDGF-BB, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7]; pro-inflammatory cytokines [IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70, IFN- γ , IL-15, IL-17]; and regulatory cytokines [IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13]. The average levels of all biomarkers in the "SC" and "T" subgroups were compared between groups, with no significant differences. Immunologically, biomarker levels revealed similarities between the vaginal microenvironments of the two groups [Figure 2].

Pelvic floor muscle function as assessed using EFSMAP did not differ significantly between the groups at the end of the 12-month follow-up [Table 3].

No significant differences were observed between the groups in the pelvic floor function scores measured using the PFDI and PFIQ-7 questionnaires before and at 12 months post-treatment. The SF-12 questionnaire, which assesses quality of life, also showed no significant differences between the groups before or after treatment [Table 4].

Discussion

The main contributions of this study were the unprecedented use of EFSMAP to assess pelvic floor muscle function and the study of vaginal immunity through microbiome and biomarkers in vaginal fluid in patients treated for vaginal agenesis. Furthermore, the study presented positive outcomes in both treatment groups, indicating that dilation is as effective as surgery. This negates our hypothesis.

In general, patients with vaginal agenesis seek medical care during adolescence due to primary amenorrhea. The participants in this study sought our services later because they wanted to be sexually active, and all were over 17 years of age. One patient was 51 years old, showing that in rare situations, diagnosis, as well as the wish to have a vagina for intercourse, may be delayed. It is important to assess the sexual function of these patients objectively with validated questionnaires and not only using a visual analog scale. We used the FSFI for this purpose, and among the 10 patients who were sexually active at the 12-month follow-up, the results were satisfactory, which is consistent with other studies [15,18]. Our study showed lower scores in the lubrication domain of the FSFI than in the general population, as reported in other studies [15]. Although the groups differed in vaginal length [$p = 0.004$], with the surgical group having a longer vaginal length, this difference did not appear to affect sexual satisfaction; other authors have observed similar results [19,20].

Cytology and HPV-DNA testing is not usually performed on patients with a neovagina, whether created surgically or through dilation, just as these tests are not routinely performed in patients without a uterus because the incidence of vaginal cancer in the general population is low. One concern, however, is whether the incidence of cancer in a neovagina differs from that of a normal

vagina and what the most effective prevention strategy should be, considering that these patients may be exposed to HPV upon becoming sexually active [21]. This aspect should be considered in the follow-up of these patients [22]. It is important to correlate abnormal or positive cytology results with the specific type of HPV, and we observed this correlation in 40% of patients in Group 2. Other studies have not reported this prevalence; this stood out because it appeared specifically in the dilation group, despite the small sample size, and because the patients in this group were young [23]. Two patients in Group 1 also tested positive for HPV-DNA, and only one had a positive cytopathological test. It may also be worth including HPV-DNA screening in the follow-up of these patients [22]. Although rare, vaginal carcinoma may pose a risk after vaginal reconstruction, regardless of the technique used. Gynecological consultations, including speculum examination, HPV-DNA testing, and/or cytopathological examination should be individualized [22].

Studies of the microbiome and vaginal immunity in patients with a neovagina have only recently been performed [24]. In our study, lactobacillary flora was predominant in Group 2, with a significant difference observed between the groups. This finding likely relates to the vaginal pH remaining closer to normal in this group. The delayed healing process of the neovagina after surgery may contribute to the predominance of non-lactobacillary flora, as observed at the 12-month follow-up [25].

The consolidation of squamous epithelium in the neovagina is important for maintaining vaginal cellular immunity, stabilizing pH, providing local defense against infectious agents, and supporting sexual function [26]. The absence of squamous epithelium in Group 1 at the 12-month follow-up could be explained

by the timing of the biopsy, because other studies with longer follow-up periods have shown the transformation into stratified squamous epithelium at 24 months [7]. Conversely, the increased presence of granulation tissue in Group 1 reflects the postoperative healing process, which explains the significant difference observed when compared with Group 2.

The analysis of immune biomarkers in the vaginal mucosa remains underexplored in women with vaginal agenesis. We conducted a thorough evaluation of chemokines, cell growth factors, pro-inflammatory cytokines, and regulatory cytokines. We found no significant differences in the levels of these biomarkers when comparing the groups, regardless of the bacterial flora type, likely due to the absence of HPV effects on the mucosa in most participants. Recent studies have shown increased levels of immune biomarkers in cervicovaginal fluid associated with high-risk HPV infection [27].

Pelvic floor muscle function is also seldom studied in patients with neovaginas. Some studies have assessed this musculature in transgender patients who have undergone neovaginoplasty [28], however we believe this may differ in cisgender women. Our evaluation was performed thoroughly and objectively, employing validated equipment based on the International Classification of Functioning Disability and Health [ICF] [29]. Although no differences emerged between the groups, we highlight that 50% of the sample exhibited increased muscle tone, and most patients experienced pain upon palpation regardless of the group. This finding has also been observed in young women with a vagina.

In addition to vaginal length, we assessed pelvic floor function and the impact of treatment on the quality of life before and 12 months after the

intervention, regardless of whether it involved surgery or dilation. We did not observe significant differences based on the questionnaire scores collected pre- and post-treatment.

This study's strengths lie in [1] the thorough evaluation of pelvic floor musculature using the EFSMAP, which provided reliable data despite group similarities; [2] the detailed characterization of vaginal immune responses in patients treated for vaginal agenesis; and [3] the objective assessment of sexual function, addressing the main concerns of the participants. Additionally, the identification and discussion of HPV-DNA presence and cytological abnormalities in three patients highlight important implications for developing future HPV screening guidelines in this population. The limitations of this study include the small number of participants, because of the rarity of vaginal agenesis, and the relatively short follow-up period. Another limitation was that we conducted a comparative study using a limited sample size. However, considering the multiple outcomes assessed, we believe it is valuable to highlight the subtle differences observed between the groups.

Conclusion

The immune response and pelvic floor function were similar for surgical treatment and dilation at the 12-month post-treatment evaluation of patients with vaginal agenesis in this sample.

EFSMAP can be used to assess pelvic floor function in patients treated for vaginal agenesis. HPV screening in these patients warrants discussion, and further studies are necessary to determine its indication .

Declarations

Ethical approval

The study was approved by the Research Ethics Committee under CAAE Number 33647220200005149. All patients provided informed consent.

Funding

None

Conflict of Interests

The author declares no conflicts of interest.

1. Committee on Adolescent Health Care. ACOG Committee Opinion No. 728: Müllerian Agenesis: Diagnosis, Management, And Treatment. *Obstetrics and gynecology*. 2018 Jan;131[1]:e35–42.
2. Fontana L, Gentilin B, Fedele L, Gervasini C, Miozzo M. Genetics of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser [MRKH] syndrome. *Clin Genet*. 2017 Feb;91[2]:233–46.
3. Laufer MR. Congenital absence of the vagina: in search of the perfect solution. When, and by what technique, should a vagina be created? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2002 Oct;14[5]:441–4.
4. Apfel VR, Takano CC, Marquini G V, de Jarmy di Bella ZIK, Girão MJBC, Sartori MGF. Treatment for vaginal agenesis: A prospective and comparative study between vaginal dilation and surgical neovaginoplasty. *Int J Gynaecol Obstet*. 2022 Jun;157[3]:574–81.
5. Thomas JC, Brock JW. Vaginal Substitution: Attempts to Create the Ideal Replacement. *Journal of Urology*. 2007 Nov;178[5]:1855–9.
6. Shrivastava V, Deedwania P, Gupta B. Use of Oxidized Regenerated Cellulose in Vaginoplasty Surgeries: Review of Safety, Vaginal Epithelization, and Sexual Satisfaction. *Journal of South Asian Federation of Obstetrics and Gynaecology*. 2023 May 11;15[2]:226–31.
7. Torres ATS, Lopes BB, Silva AM, Dias MTPM, Bruno ZV, Nunes APN, et al. Neovaginoplasty with tilapia fish skin: a series of eleven cases. *Int Urogynecol J*. 2022 Aug 21;33[8]:2185–93.
8. Wang Y, Wang X, Zhu M, Ge L, Liu X, Su K, et al. The Interplay Between Cervicovaginal Microbial Dysbiosis and Cervicovaginal Immunity. *Front Immunol*. 2022 Mar 10;13.
9. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol*. 2011 Mar;88[2]:185–94.
10. Rall K, Schoenfisch B, Schoeller D, Stefanescu D, Koelle A, Henes M, et al. Vaginal prevalence of human papillomavirus infections in women with uterovaginal aplasia before and after laparoscopically assisted creation of a neovagina: a prospective epidemiological observational study. *BJOG*. 2019 Jan 20;126[1]:65–72.
11. Bump RC, Norton PA. EPIDEMIOLOGY AND NATURAL HISTORY OF PELVIC FLOOR DYSFUNCTION. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1998 Dec;25[4]:723–46.

12. Vieira GF, Saltiel F, Miranda-Gazzola APG, Kirkwood RN, Figueiredo EM. Pelvic floor muscle function in women with and without urinary incontinence: are strength and endurance the only relevant functions? a cross-sectional study. *Physiotherapy*. 2020 Dec;109:85–93.
13. Leite MTC, Shida MEF, Takano CC. Vaginoplasty with Oxidized Cellulose in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome. *J Indian Assoc Pediatr Surg*. 2021;26[2]:128–30. doi: 10.4103/jiaps.JIAPS_76_20
14. WIEGEL M, MESTON C, ROSEN R. The Female Sexual Function Index [FSFI]: Cross-Validation and Development of Clinical Cutoff Scores. *J Sex Marital Ther*. 2005 Jan;31[1]:1–20. doi: 10.1080/00926230590475206
15. HadaviBavili P, İlçioğlu K, Hamlacı Başkaya Y. Evaluation of Sexual Function Outcomes in Patients with Rokitansky Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2023 Sep;30[9]:705–15. doi: 10.1016/j.jmig.2023.05.014
16. Saltiel F, Miranda-Gazzola APG, Vieira GF, Figueiredo EM. Advancing women's pelvic floor muscle function diagnosis: the EFSMAP examination and its reliability evaluation. *Braz J Phys Ther*. 2024;28[3]:101067. doi: 10.1016/j.bjpt.2024.101067
17. Thiel R do RC, Dambros M, Palma PCR, Thiel M, Riccetto CLZ, Ramos M de F. Tradução para português, adaptação cultural e validação do Female Sexual Function Index. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2008 Oct;30[10]:504–10. doi: 10.1590/s0100-72032008001000005
18. Arouca MAF, Duarte TB, Lott DAM, Magnani PS, Nogueira AA, Rosa-e-Silva JC, et al. Validation and cultural translation for Brazilian Portuguese version of the Pelvic Floor Impact Questionnaire [PFIQ-7] and Pelvic Floor Distress Inventory [PFDI-20]. *Int Urogynecol J*. 2016 Jul 19;27[7]:1097–106. doi: 10.1007/s00192-015-2938-8
19. Dabaghi S, Zandi M, Ilkhani M. Sexual satisfaction in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome after surgical and non-surgical techniques: a systematic review. *Int Urogynecol J*. 2019 Mar 5;30[3]:353–62. doi: 10.1007/s00192-018-3854-5
20. Callens N, De Cuypere G, Wolffenbuttel KP, Beerendonk CCM, van der Zwan YG, van den Berg M, et al. Long-Term Psychosexual and Anatomical Outcome After Vaginal Dilation or Vaginoplasty: A Comparative Study. *J Sex Med*. 2012 Jul 1;9[7]:1842–51. doi: 10.1111/j.1743-6109.2012.02747.x
21. Frega A, Scirpa P, Sopracordevole F, Biamonti A, Bianchi P, De Sanctis L, et al. Impact of human papillomavirus infection on the neovaginal and vulval tissues of women who underwent surgical treatment for Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Fertil Steril*. 2011 Oct;96[4]:969–73. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.07.1099

22. Fedele F, Bulfoni A, Parazzini F, Busnelli A. Neovagina creation methods in Müllerian anomalies and risk of malignancy: insights from a systematic review. *Arch Gynecol Obstet*. 2023 Jul 19;309[3]:801–12. doi: 10.1007/s00404-023-07086-6
23. Rall K, Schoenfisch B, Schoeller D, Stefanescu D, Koelle A, Henes M, et al. Vaginal prevalence of human papillomavirus infections in women with uterovaginal aplasia before and after laparoscopically assisted creation of a neovagina: a prospective epidemiological observational study. *BJOG*. 2019 Jan 20;126[1]:65–72. doi: 10.1111/1471-0528.15404
24. Chen N, Hao L, Zhang Z, Qin C, Jie Z, Pan H, et al. Insights into the assembly of the neovaginal microbiota in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser [MRKH] syndrome patients. *Nat Commun*. 2024 Sep 6;15[1]:7808. doi: 10.1038/s41467-024-52102-1
25. Teófilo CR, Peixoto RAC, Eleutério RMN, Lima Junior EM, de Moraes Filho MO, Bezerra LRPS, et al. Neovaginoplasty With Nile Tilapia Skin: Cytological and Microbiota Evaluation. *J Low Genit Tract Dis*. 2023 Jul;27[3]:275–9. doi: 10.1097/LGT.0000000000000740
26. 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 Apr;220[4]:324–35. doi: 10.1016/j.ajog.2018.11.1089
27. Olukomogbon T, Akpobome B, Omole A, Adebamowo CA, Adebamowo SN. Association Between Cervical Inflammatory Mediators and Prevalent Cervical Human Papillomavirus Infection. *JCO Glob Oncol*. 2024 Mar;[10]. doi: 10.1200/GO.23.00380
28. Manrique OJ, Adabi K, Huang TCT, Jorge-Martinez J, Meihofer LE, Brassard P, et al. Assessment of Pelvic Floor Anatomy for Male-to-Female Vaginoplasty and the Role of Physical Therapy on Functional and Patient-Reported Outcomes. *Ann Plast Surg*. 2019 Jun;82[6]:661–6. doi:10.1097/SAP.0000000000001680
29. VanSant AF. The International Classification of Functioning, Disability and Health. *Pediatric Physical Therapy*. 2006;18[4]:237. doi: 10.1097.pep.0000245823.888.71

Figure legends

Figure 1 Participant recruitment flowchart

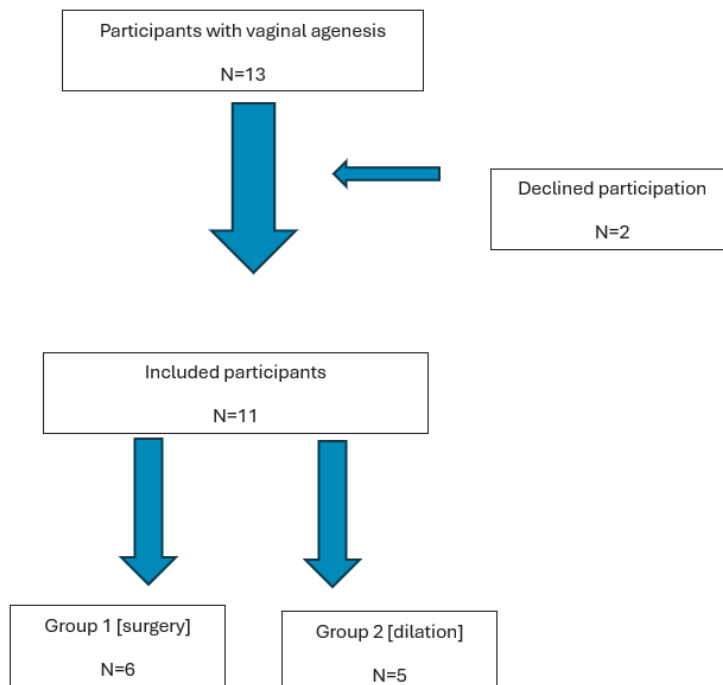


Figure 2 Quantification of vaginal fluid biomarkers. i. Chemokines: CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10; ii. Growth factors: FGF-basic, PDGF-BB, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7; iii. Pro-inflammatory cytokines: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70, IFN- γ , IL-15, IL-17; iv. Regulatory cytokines: IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13

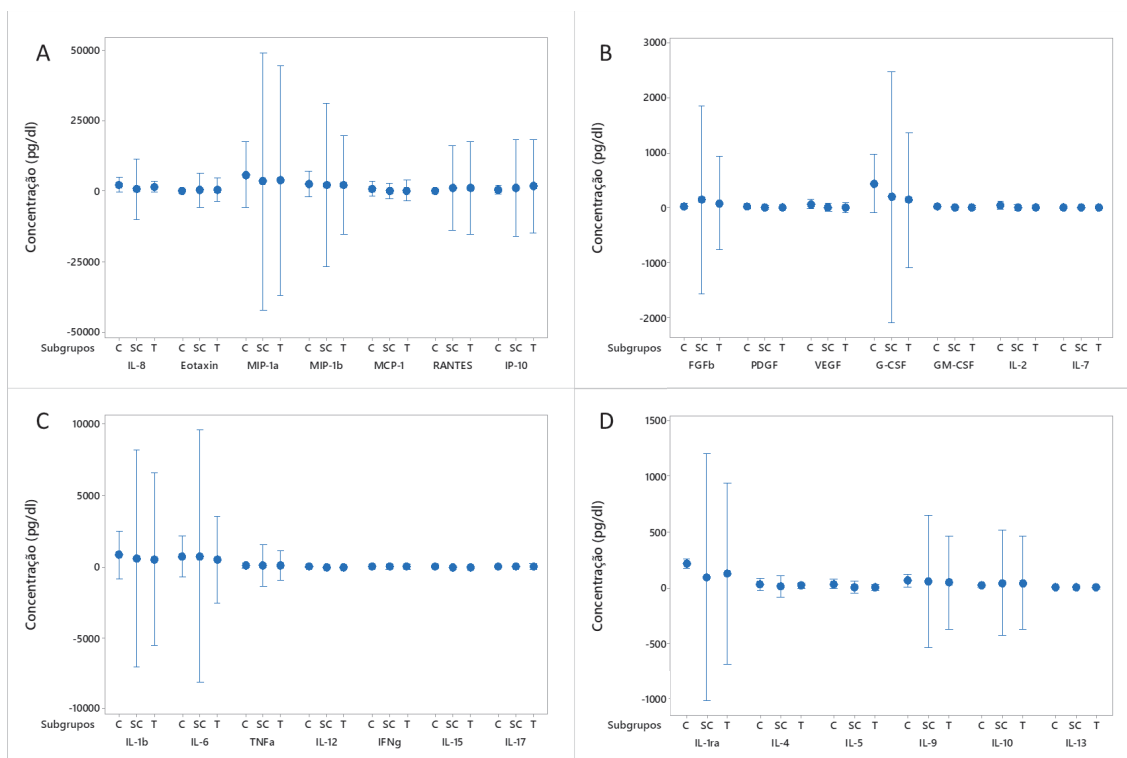


Table 1 Clinical variables and FSFI questionnaire at the 12-month follow-up

| Clinical variables | Group 1 | | Group 2 | | p-value* |
|---------------------|---------|------|---------|-------|----------|
| | Mean | SD | Mean | SD | |
| Age | 29.6 | 11.4 | 22.2 | 4.9 | 0.119 |
| Follow-up [days] | 319.5 | 74.4 | 364.2 | 132.3 | 0.506 |
| Vaginal pain | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.999 |
| Vaginal length [cm] | 8.0 | 1.6 | 5.0 | 0.0 | 0.004 |
| pH | 7.3 | 0.5 | 5.0 | 0.0 | 0.004 |
| FSFI | 18.1 | 1.1 | 17.6 | 8.6 | 0.277 |

FSFI: Female sexual function index; SD: standard deviation

* Mann–Whitney tests were significant at 5%.

Table 2 Vaginal microbiome comparison at the 12-month follow-up

| Group | Lactobacillary flora n [%] | Non-lactobacillary flora n [%] | Total n [%] | p-value |
|-------|-------------------------------|-----------------------------------|----------------|---------|
| 1 | 1 16.67 | 5 83.33 | 6 100.00 | |
| 2 | 4 80.00 | 1 20.00 | 5 100.00 | |
| Total | 5 45.45 | 6 54.55 | 11 100.00 | 0.036 |

*Pearson Chi-Square

Table 3 Assessment of pelvic floor muscle function using EFSMAP at the 12-month follow-up

| Muscle function | Group 1 | | Group 2 | | p-value |
|--------------------------------|---------|-------|---------|-------|---------|
| | n | % | n | % | |
| Inspection- contraction | | | | | |
| Absent | 0 | 0,0 | 1 | 20,0 | 0.455 |
| Present | 6 | 100.0 | 4 | 80.0 | |
| Sensitivity to pressure | | | | | |
| Absent | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | - |
| Present | 6 | 100.0 | 5 | 100.0 | |
| Localized pain | | | | | |
| Yes | 4 | 66.7 | 4 | 80.0 | 0.576 |
| No | 2 | 33.3 | 1 | 20.0 | |
| Muscle tone | | | | | |
| Normal | 3 | 50.0 | 2 | 40.0 | 0.608 |
| High | 3 | 50.0 | 3 | 60.0 | |
| Ability to contract | | | | | |
| Absent | 1 | 16.7 | 1 | 20.0 | 0.727 |
| Present | 5 | 83.3 | 4 | 80.0 | |
| Ability to relax | | | | | |
| | 6 | 100.0 | 3 | 60.0 | - |
| Muscle strength [Oxford scale] | | | | | |
| 2 | 2 | 33.3 | 1 | 20.0 | |
| 3 | 4 | 66.7 | 3 | 60.0 | |
| Resistance | | | | | |
| | Mean | | Mean | | p-value |
| | 7.3 | | 6.2 | | 0.697 |

* Mann–Whitney test

Table 4 Pelvic floor function and quality of life questionnaires before and 12 months after treatment

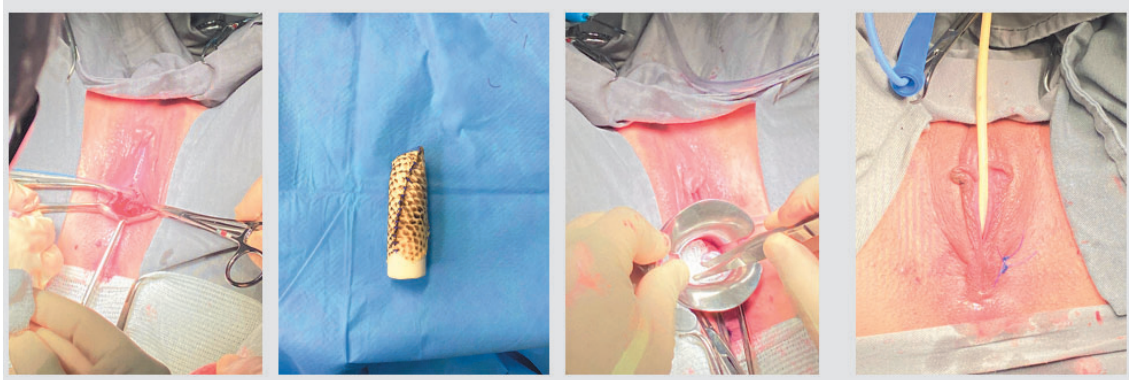
| Questionnaire | Before treatment | | | | | | 12 months after treatment | | | | | | p-value |
|---------------|------------------|------|--------|--------------------------|--------------------------|-----------------|---------------------------|------|--------|--------------------------|--------------------------|-----------------|---------|
| | Mean | SD | Median | 1 st Quartile | 3 rd Quartile | Minimum-Maximum | Mean | SD | Median | 1 st Quartile | 3 rd Quartile | Minimum-Maximum | |
| PFDI | 2.2 | 3.8 | 0.0 | 0.0 | 6.3 | 0.0-10 | 16.1 | 17.9 | 10.0 | 0,0 | 36.0 | 0.0- 43.8 | 0.063 |
| PFIQ7 | 1.3 | 3.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0-10 | 7.4 | 11.5 | 0.0 | 0.0 | 14.0 | 0.0-28.5 | 0.250 |
| SF12PCS12 | 51.0 | 17.2 | 56.0 | 52.0 | 58.0 | 0.0-60 | 47.2 | 17.8 | 54.0 | 52.0 | 56.0 | 0.0-58 | 0.148 |
| SF12MCS | 46.2 | 16.1 | 49.0 | 44.0 | 53.0 | 0.0-59 | 45.9 | 17.1 | 53.0 | 40.0 | 56.0 | 0.0-60.0 | 0.844 |

PFDI: pelvic floor distress inventory questionnaire, PFIQ-7: pelvic floor impact questionnaire, SF12PCS: short form health survey physical component, SF12MCS: short form health survey mental component

* Wilcoxon test

APPENDICES

Appendix 1: Neovaginoplasty using tilapia skin



Appendix 2: Vaginal dilator kit and protocols for postoperative care and progressive dilation



- Dilator No. 1: Diameter of 1.16 cm, length of 6.5 cm, and weight of 14 g.
- Dilator No. 2: Diameter of 1.90 cm, length of 7.5 cm, and weight of 30 g.
- Dilator No. 3: Diameter of 2.15 cm, length of 8.7 cm, and weight of 46 g.

- Dilator No. 4: Diameter of 2.5 cm, length of 10.9 cm, and weight of 57 g.
- Dilator No. 5: Diameter of 3.10 cm, length of 13.20 cm, and weight of 111 g.
- Dilator No. 6: Diameter of 4 cm, length of 14.5 cm, and weight of 191 g.

Post-Surgical Protocol

Use the largest possible dilator for 24 h/day for 3 months. Remove only for hygiene and bathroom use.

Perform intimate hygiene with mild soap, including cleaning the dilator with mild soap.

After the initial 3 months and upon the start of sexual activity, use the dilator only at night, when sleeping.

Dilation Protocol [Non-Surgical]

In a semi-seated position with knees bent, apply the silicone vaginal dilator for 20 min, three times a day. As progress is made, advance to larger-sized dilators until reaching dilator No. 5 [Absoloo®]. Once the desired length is achieved [with dilator No. 4 or 5], maintain dilation at least three times per week. After initiating sexual activity, continue dilation only if sexual intercourse is irregular or infrequent.

Appendix 3: Detection of immunological biomarkers in cervicovaginal fluid

Cervical fluid samples previously collected and stored at -80°C in saline solution were used to determine the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, chemokines, and growth factors [Tube 1]. These biomarkers were quantified using the Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex kit [Bio-Rad Laboratories], which

employs 27 magnetic beads, each with a unique intensity and fluorescence profile, coated with specific antibodies that detect human cytokines, chemokines, and growth factors. This method allows the simultaneous analysis of 27 biomarkers in a single assay [pro-inflammatory cytokines: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70, IFN- γ , IL-15 and IL-17; regulatory cytokines: IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13; chemokines: CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10; growth factors: FGF-basic, PDGF-BB, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7], using small sample volumes. In brief, cervical fluid samples were carefully thawed and homogenized, then 300 μ L aliquots were transferred into microtubes. The samples were centrifuged at 1,400 rpm and 18°C for 5 min. After this step, 90 μ L of the supernatant was carefully transferred into flat-bottom plates, which already contained 50 μ L of human cytokine, chemokine, and growth factor standards diluted serially with Assay Buffer [a reagent included in the Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex kit]. Additionally, we added 50 μ L of quality controls 1 and 2, as well as 50 μ L of Assay Buffer [Background], to ensure the reliability of the results. Finally, 25 μ L of the magnetic bead mixture conjugated with monoclonal antibodies were added into each well, sealing the preparation for the subsequent analysis steps.

The plates, properly sealed, underwent incubation for 18 h at 4°C with shaking at 500 \pm 50 rpm. After this period, the plates were washed with 200 μ L of 1x Wash Buffer using a magnetic support. Then, 25 μ L of detection antibody was added to each well, and following a 1-h incubation, another 25 μ L of the detection reagent [Streptavidin conjugated to phycoerythrin [PE] fluorescent dye] was added to each well. After a further 30-min incubation, the plates were washed again with 200 μ L of 1x Wash Buffer. Then, 150 μ L of Sheath Fluid reagent was added, followed by a sample reading on the Bio-Plex 200 system according to the manufacturer's instructions. Data analysis was performed using the Bio-Plex Manager software

[Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA]. The entire data acquisition and analysis process took place at the Flow Cytometry platform of the René Rachou Institute [IRR] – FIOCRUZ/Minas.

Referências

1. Rock JA, Azziz R. Genital anomalies in childhood. *Clin Obstet Gynecol.* setembro de 1987;30(3):682–96.
2. Oppelt P, Renner SP, Kellermann A, Brucker S, Hauser GA, Ludwig KS, et al. Clinical aspects of Mayer–Rokitansky–Kuester–Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging. *Human Reproduction.* 1º de março de 2006;21(3):792–7.
3. Fontana L, Gentilin B, Fedele L, Gervasini C, Miozzo M. Genetics of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. *Clin Genet.* fevereiro de 2017;91(2):233–46.
4. Committee on Adolescent Health Care. ACOG Committee Opinion No. 728: Müllerian Agenesis: Diagnosis, Management, And Treatment. *Obstetrics and gynecology.* janeiro de 2018;131(1):e35–42.
5. Sarpel U, Palmer SK, Dolgin SE. The incidence of complete androgen insensitivity in girls with inguinal hernias and assessment of screening by vaginal length measurement. *J Pediatr Surg.* janeiro de 2005;40(1):133–7.
6. Takano CC, Sartori MGF. The Use of Three-dimensional Printer Molds for Treatment of Vaginal Agenesis. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics.* 29 de dezembro de 2022;44(12):1081–2.
7. ACOG Committee on Adolescent Health Care. ACOG Committee Opinion No. 355: Vaginal agenesis: diagnosis, management, and routine care. *Obstetrics and gynecology.* dezembro de 2006;108(6):1605–9.
8. Panici PB, Bellati F, Boni T, Francescangeli F, Frati L, Marchese C. Vaginoplasty using autologous in vitro cultured vaginal tissue in a patient with Mayer-von-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Human Reproduction.* 1º de julho de 2007;22(7):2025–8.
9. Laufer MR. Congenital absence of the vagina: in search of the perfect solution. When, and by what technique, should a vagina be created? *Curr Opin Obstet Gynecol.* outubro de 2002;14(5):441–4.
10. Davies MC, Creighton SM. Vaginoplasty. *Curr Opin Urol.* novembro de 2007;17(6):415–8.
11. Oelschlager AMA, Debiec K, Appelbaum H. Primary vaginal dilation for vaginal agenesis: strategies to anticipate challenges and optimize outcomes. *Curr Opin Obstet Gynecol.* outubro de 2016;28(5):345–9.

12. McVeary ME, Warner WB. Use of Physical Therapy to Augment Dilator Treatment for Vaginal Agenesis. *Female Pelvic Med Reconstr Surg.* maio de 2011;17(3):153–6.
13. Apfel VR, Takano CC, Marquini G V, de Jarmy di Bella ZIK, Girão MJBC, Sartori MGF. Treatment for vaginal agenesis: A prospective and comparative study between vaginal dilation and surgical neovaginoplasty. *Int J Gynaecol Obstet.* junho de 2022;157(3):574–81.
14. Thomas JC, Brock JW. Vaginal Substitution: Attempts to Create the Ideal Replacement. *Journal of Urology.* novembro de 2007;178(5):1855–9.
15. 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.* abril de 2019;220(4):324–35.
16. Moosa Y, Kwon D, de Oliveira T, Wong EB. Determinants of Vaginal Microbiota Composition. *Front Cell Infect Microbiol.* 2 de setembro de 2020;10.
17. Wang Y, Wang X, Zhu M, Ge L, Liu X, Su K, et al. The Interplay Between Cervicovaginal Microbial Dysbiosis and Cervicovaginal Immunity. *Front Immunol.* 10 de março de 2022;13.
18. Wang T, Zhang H, Liu Y, Zhao C. Updates in Cervical Cancer Screening Guidelines, The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, and Clinical Management Recommendations. *Journal of Clinical and Translational Pathology.* 21 de abril de 2023;000(000):000–000.
19. Curry SJ, Krist AH, Owens DK, Barry MJ, Caughey AB, Davidson KW, et al. Screening for Cervical Cancer. *JAMA.* 21 de agosto de 2018;320(7):674.
20. Birse KD, Kratzer K, Zuend CF, Mutch S, Noël-Romas L, Lamont A, et al. The neovaginal microbiome of transgender women post-gender reassignment surgery. *Microbiome.* 5 de dezembro de 2020;8(1):61.
21. Frega A, Scirpa P, Sopracordevole F, Biamonti A, Bianchi P, De Sanctis L, et al. Impact of human papillomavirus infection on the neovaginal and vulval tissues of women who underwent surgical treatment for Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Fertil Steril.* outubro de 2011;96(4):969–73.
22. Fernández-Ruiz M, Pantoja-Garrido M, Frías-Sánchez Z, Rodríguez-Jiménez I, Aguilar- Martín M del V. Carcinoma epidermoide de neovagina en paciente con síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser. Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 30 de dezembro de 2019;70(4):266–76.
23. Barberini F, Vizza E, Montanino M, Marcoccia S, Montanino G. Vaginal reconstruction by skin grafts: A scanning electron microscopic evaluation.

Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger. dezembro de 1992;174(6):517–22.

24. Alessandrescu D, Peltecu GC, Buhimschi CS, Buhimschi IA. Neocolpoptosis with split-thickness skin graft as a surgical treatment of vaginal agenesis: Retrospective review of 201 cases. *Am J Obstet Gynecol.* julho de 1996;175(1):131–8.
25. Motoyama S, Laoag-Fernandez JB, Mochizuki S, Yamabe S, Maruo T. Vaginoplasty with Interceed absorbable adhesion barrier for complete squamous epithelialization in vaginal agenesis. *Am J Obstet Gynecol.* maio de 2003;188(5):1260–4.
26. Noguchi S. Use of artificial dermis and recombinant basic fibroblast growth factor for creating a neovagina in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Human Reproduction.* 1º de julho de 2004;19(7):1629–32.
27. Panici PB, Bellati F, Boni T, Francescangeli F, Frati L, Marchese C. Vaginoplasty using autologous in vitro cultured vaginal tissue in a patient with Mayer-von-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Human Reproduction.* 1º de julho de 2007;22(7):2025–8.
28. Inagaki M, Motoyama S, Laoag-Fernandez JB, Yasuda R, Maruo T. Two case reports of less invasive surgery using interceed (oxidized regenerated cellulose) absorbable adhesion barrier for vaginoplasty in Meyer-Rokitansky-Küsterhauser syndrome. *Int Surg.* 2009;94(1):48–53.
29. Fedele L, Frontino G, Restelli E, Ciappina N, Motta F, Bianchi S. Creation of a neovagina by Davydov's laparoscopic modified technique in patients with Rokitansky syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* janeiro de 2010;202(1):33.e1-33.e6.
30. Dornelas J, Jármy-Di Bella ZIK, Heinke T, Kajikawa MM, Takano CC, Zucchi EVM, et al. Vaginoplasty with oxidized cellulose: anatomical, functional and histological evaluation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* agosto de 2012;163(2):204–9.
31. Crema L, Jármy Di-Bella Z, Takano C, Castro R, Simões M de J, Ferreira Sartori MG, et al. The Morphological Aspects of Neovaginoplasty Using Oxidized Cellulose Membrane (Interceed®). *J Gynecol Surg.* agosto de 2013;29(4):169–73.
32. Dias MTPM, Bilhar APM, Rios LC, Costa BA, Lima Júnior EM, Alves APNN, et al. Neovaginoplasty Using Nile Tilapia Fish Skin as a New Biologic Graft in Patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome. *J Minim Invasive Gynecol.* maio de 2020;27(4):966–72.

33. Pavan LI, Bourguignon GA, Ubertazzi EP. Vaginoplasty: modified McIndoe using xenograft and a tailored 3D-printer mold. *Int Urogynecol J*. 4 de agosto de 2021;32(8):2283–5.
34. Torres ATS, Lopes BB, Silva AM, Dias MTPM, Bruno ZV, Nunes APN, et al. Neovaginoplasty with tilapia fish skin: a series of eleven cases. *Int Urogynecol J*. 21 de agosto de 2022;33(8):2185–93.
35. Saltiel F, Miranda-Gazzola APG, Vitória RO, Sampaio RF, Figueiredo EM. Linking Pelvic Floor Muscle Function Terminology to the International Classification of Functioning, Disability and Health. *Phys Ther*. 31 de agosto de 2020;100(9):1659–80.
36. Saltiel F, Miranda-Gazzola APG, Vieira GF, Figueiredo EM. Advancing women's pelvic floor muscle function diagnosis: the EFSMAP examination and its reliability evaluation. *Braz J Phys Ther*. 2024;28(3):101067.
37. WIEGEL M, MESTON C, ROSEN R. The Female Sexual Function Index (FSFI): Cross-Validation and Development of Clinical Cutoff Scores. *J Sex Marital Ther*. janeiro de 2005;31(1):1–20.
38. Thiel R do RC, Dambros M, Palma PCR, Thiel M, Riccetto CLZ, Ramos M de F. Tradução para português, adaptação cultural e validação do Female Sexual Function Index. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. outubro de 2008;30(10):504–10.
39. WARE JE, KOSINSKI M, KELLER SD. A 12-Item Short-Form Health Survey. *Med Care*. março de 1996;34(3):220–33.
40. Andrade TL, Camelier AA, Rosa FW, Santos MP, Jezler S, Silva JLP e. Aplicabilidade do questionário de qualidade de vida relacionada à saúde - the 12-Item Short-Form Health Survey - em pacientes portadores de esclerose sistêmica progressiva. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. agosto de 2007;33(4):414–22.
41. Arouca MAF, Duarte TB, Lott DAM, Magnani PS, Nogueira AA, Rosa-e-Silva JC, et al. Validation and cultural translation for Brazilian Portuguese version of the Pelvic Floor Impact Questionnaire (PFIQ-7) and Pelvic Floor Distress Inventory (PFDI-20). *Int Urogynecol J*. 19 de julho de 2016;27(7):1097–106.