

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/02/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Júlia Andrade Pessoa Morales

**The vaginal microbiome of reproductive-age women is an
indicator of cervical human papillomavirus infection**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências – Área: Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Camila Marconi

**Botucatu
2020**

Júlia Andrade Pessoa Morales

The vaginal microbiome is an indicator of cervical human papillomavirus infection

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Área: Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Camila Marconi

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Morales, Julia Andrade Pessoa.

The vaginal microbiome of reproductive-age women is an indicator of cervical human papillomavirus infection / Julia Andrade Pessoa Morales. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marcia Guimarães da Silva

Coorientador: Camila Marconi

Capes: 40105008

1. Doenças por papilomavírus. 2. Papillomaviridae.
3. Microbiota. 4. Papillomaviridae. 5. Vagina - Infecções.

Palavras-chave: HPV; Microbioma vaginal; Microbiota vaginal; Papillomavírus humano.

Sumário

| | |
|------------------------------------|-----------|
| Resumo..... | 8 |
| Abstract..... | 10 |
| Revisão de Literatura | 12 |
| Referências..... | 21 |
| Artigo Científico..... | 24 |
| 1. Abstract..... | 26 |
| 2. Introduction..... | 27 |
| 3. Results | 32 |
| 4. Discussion | 35 |
| 5. Conclusion | 41 |
| 6. References..... | 41 |

Dedico este trabalho à minha mãe, Isabel, por ter abdicado tantas vezes de suas próprias vontades em prol da realização dos nossos sonhos, e, por sempre ter me incentivado à estudar.

Obrigada pela formação sólida e ética, nada disso seria possível sem você.

Agradecimento

Sou grata a cada uma das pessoas que passou pelo meu caminho até aqui, permitindo que eu me tornasse quem eu sou hoje, do ponto de vista pessoal, profissional e humano.

Diversas pessoas, conversas e vivências compõem a essência de quem eu sou hoje. Meu eterno muito obrigada a todos esses valiosos instantes de tempo, lembranças e sentimentos, compartilhados com tantas pessoas.

A finalização deste ciclo, para mim, representa muito além da obtenção de um título acadêmico; representa também a realização da jornada de um grande encontro comigo mesma.

Agradeço, também, às diversas fontes de fomento que permitiram minha formação e a consolidação desse estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, CNPq e Fapesp (Processos 2018/18469-9, 2012/16800-3, 2012/01278-0).

“Educar é impregnar de sentido o que fazemos a cada instante.”

Paulo Freire

Resumo

Introdução: O entendimento do papel desempenhado pela microbiota vaginal para a saúde reprodutiva tem ganhado destaque na literatura mundial, especialmente no que se refere à associação com a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Diversos fatores de risco para a infecção por HPV já foram identificados, com destaque para a vaginose bacteriana (VB). Apesar de tal associação já ter sido demonstrada, diversos aspectos dessa relação permanecem desconhecidos, dada a diversidade microbiana presente no ambiente vaginal. Embora a recente caracterização do microbioma vaginal tenha permitido o conhecimento da real composição microbiana nesse ambiente, a relação entre componentes do microbioma vaginal e a infecção por HPV permanece por ser elucidada. **Objetivo:** O objetivo desse estudo é avaliar a associação entre componentes do microbioma vaginal e a infecção cervical por genótipos de alto risco oncogênico do HPV (hrHPV). **Pacientes e Métodos:** Trata-se de estudo transversal incluindo 546 mulheres oriundas das 5 macrorregiões brasileiras incluídas em estudo prévio intitulado “Caracterização do microbioma vaginal de mulheres brasileiras em idade reprodutiva”. O microbioma vaginal foi determinado pelo sequenciamento das regiões V3-V4 do gene bacteriano RNAr 16S em equipamento MiSeq Plataforma 300PE (Illumina, San Diego, CA) e agrupados em *community-state types* (CSTs). Amostras cervicais foram submetidas à pesquisa e genotipagem de HPV empregando-se o kit *Linear Array HPV genotyping* (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Modelos de regressão logística *stepwise* (forward, $P < 0,15$) foram utilizados para a construção de dois escores lineares para prever a positividade para hrHPV: um baseado exclusivamente na presença dos taxons bacterianos identificados (*microbiome-based [MB] score*) e o outro baseado exclusivamente em características sociodemográficas, comportamentais e clínicas (*SBC score*). O *MB score* combinou coeficientes de 30 (de 116) espécies retidas no modelo. O *SBC score* reteu 6 (idade, estatus marital, nova parceria sexual, uso de contraceptivo hormonal, índice de massa corporal, e tabagismo) de 25 variáveis candidatas. Foram construídas curvas ROC para os escores para a correlação com hrHPV e comparadas suas AUC e 95% IC para inferir a diferença em suas performances de predição. **Resultados:** A prevalência de hrHPV foi 15,8% (n=86) e 143 (26,2%)

participantes tiverem microbioma com depleção de predomínio lactobacilar. As AUC foram 0,8022 (IC: 0.7517-0.8527) para o *MB score* e 0,7027 (IC: 0.6419-0.7636) para o *SBC score* (P=0,0163 para a diferença entre AUCs). **Conclusão:** O estudo demonstra a forte correlação entre componentes do microbioma vaginal e a infecção por hrHPV, propondo a utilidade dos componentes do microbioma como indicador da infecção por hrHPV, aqui demonstrados através do *MB score*. A utilidade clínica do *score* como ferramenta preditora da infecção por hrHPV deve ser validada posteriormente em estudos longitudinais.

Abstract

Background: The understanding of the role played by vaginal microbiome on reproductive health has gained prominence in literature recently, specially regarding to its association to human papillomavirus (HPV) infection. Several risk factors for cervical HPV infection were already identified, highlighting bacterial vaginosis (BV). Despite the association between HPV and BV is well recognized, most aspects of this relation remain unknown. This is in part due to the great heterogeneity present in vaginal environment. Although the recent vaginal microbiome characterization has allowed the understanding of the real microbial composition in that local, the relation between vaginal microbiome components and HPV infection is to be elucidated. **Aim:** The aim of this study it to evaluate the association between vaginal microbiome components and cervical high-risk HPV (hrHPV) infection. **Patients and Methods:** We cross-sectionally enrolled 546 women from the five macro-regions of Brazil in previous study entitled “Characterization of the vaginal microbiome in Brazilian women of reproductive-age”. Vaginal microbiome was then determined by sequencing V3-V4 regions of bacterial rRNA 16S gene through MiSeq Platform 300PE (Illumina, San Diego, CA) and clustered in community-state types (CSTs). Cervical samples were subjected to HPV detection and genotyping using *Linear Array HPV genotyping* kit (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). We used stepwise (forward, $p < 0.15$) logistic regression to construct two linear scores to predict hrHPV positivity: one based exclusively on the presence of individual bacterial taxa (microbiom-base [MB] score) and the other exclusively on participants’ sociodemographic, behavioral and clinical (SBC) characteristics. The MB score combined coefficients of 30 (out of 116) species retained in the model. The SBC score retained six (age, marital status, new sex partner, hormonal contraceptive use, body mass index and smoking) out of 25 candidate variables. We constructed receiver operating characteristic curves for the scores as hrHPV correlates and compared the areas under the curve (AUC) and 95% confidence intervals (CI) to infer the difference in predictive performance. **Results:** The prevalence of hrHPV was 15.8% (n=86), and 143 (26.2%) participants had *Lactobacillus*-depleted vaginal microbiome. The AUCs were 0.8022 (CI: 0.7517-0.8527) for the MB score and 0.7027 (CI: 0.6419-0.7636) for the SBC score (P=0.0163 for the difference between AUCs). **Conclusions:**

Our findings demonstrate the strong correlation between vaginal microbiome components and hrHPV positivity, here demonstrated by MB score, warranting further validation of its clinical utility as a hrHPV infection predictor via longitudinal studies.

Revisão de Literatura

O câncer do colo do útero, ou câncer cervical, com 570 mil casos e 311 mil mortes estimadas em 2018 se configura como quarto em incidência e mortalidade por câncer na população feminina mundial. Apesar de seu caráter prevenível baseado em estratégias populacionais de rastreamento e vacinação, o câncer cervical permanece como um grave problema de saúde pública, especialmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.(1)

É bem estabelecido o entendimento da história natural da doença, uma vez que é comprovada a relação causal desse tipo de câncer com determinados genótipos de Papillomavírus Humano (HPV). Os papilomavírus humanos são vírus que pertencem à família *Papillomaviridae*. Atualmente, são descritos mais de 140 tipos de HPV delineados pela identidade da sequência de DNA que infectam células epiteliais humanas. Dentre esses, 40 apresentam afinidade para infecção do trato anogenital, que compreendem alguns genótipos que estão envolvidos na etiologia de lesões neoplásicas.(2) Dessa forma, os HPV genitais são classificados de acordo com o risco que conferem ao desenvolvimento de neoplasias. Os principais tipos de HPV genital de baixo risco oncogênico são os HPV6 e HPV11, que estão associados ao desenvolvimento de verrugas genitais. Já os HPV genitais de alto risco, estão associados às lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos do colo do útero.(3) Dentre os tipos de HPV de alto risco mais prevalentes, destacam-se o HPV16 e o HPV18 que, juntos, são responsáveis por mais de 70% dos casos de carcinomas epidermóides e mais de 80% dos adenocarcinomas do colo do útero.(4, 5)

Os HPV são vírus não-envelopados, constituídos por um capsídeo de simetria icosaédrica, que engloba uma molécula de DNA circular de dupla fita com aproximadamente 8000 bp.(2) O genoma

do HPV é dividido em três regiões. A primeira delas é uma região regulatória (LCR, *long control region*) que contém a origem de replicação do DNA e, portanto, responsável pelo início ciclo replicativo viral. A próxima região é a precoce (*early*) que codifica 6 proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) que possuem ação enzimática ou reguladora no ciclo replicativo viral. Dentre essas, merecem destaque as proteínas E6 e E7, codificadas pelos genes de mesmo nome, que inativam, respectivamente, os supressores tumorais p53 e pRB da célula infectada. (6-8) Dessa forma, tais proteínas estão envolvidas diretamente na imortalização dessas células e, portanto, no desenvolvimento de neoplasias. Finalmente, os genes da região tardia (*late*) que codificam as duas proteínas que compõem o capsídeo viral, a L1 e L2, proteínas essas altamente imunogênicas que são utilizadas na produção de vacinas profiláticas. (8)

O potencial oncogênico intrínseco de alguns genótipos de HPV se reflete nos achados de estudos que demonstram que 5% de todos os cânceres diagnosticados anualmente no mundo estão associados à infecção por esse vírus.(9, 10) Embora vários fatores já tenham sido associados ao desenvolvimento do câncer de colo do útero, como o *status* da imunidade do hospedeiro, presença de coinfeções genitais e comportamento sexual, a persistência da infecção por HPV de alto risco é mandatória, visto que o DNA viral está presente em 99,7% dos casos diagnosticados.(11) Por muito tempo, a principal estratégia para prevenção do câncer de colo do útero se baseou em exames citopatológicos para rastreamento de lesões pré-neoplásicas, entretanto, dada a relação causal entre a persistência da infecção pelo HPV e o desenvolvimento neoplásico, a vacinação contra o HPV foi implementada em diversas partes do mundo como uma oportunidade sem precedentes para reduzir as taxas de câncer. (12) Atualmente, pelo menos 118 milhões de mulheres já receberam uma dose da vacina de HPV. Embora esse número seja encorajador, representa apenas 3,5% da população mundial. (13)

De forma geral, as infecções por HPV's genitais são altamente prevalentes na população sexualmente ativa, e, possuem caráter predominantemente transitório, visto que a maioria das infecções é eliminada pelo sistema imunológico do hospedeiro num período de 1 a 2 anos. (6) Entretanto, o maior período de persistência da infecção por genótipos de alto risco oncogênico é o principal fator que leva ao desenvolvimento de lesões HPV induzidas no colo do útero. (7) A literatura é consistente ao demonstrar que o tempo de *clearance* para os HPV's de alto risco oncogênico é significativamente maior quando comparado aos de baixo risco. (8)

Embora o câncer cervical seja causado por infecções persistentes por genótipos de HPV's de alto risco oncogênico do HPV, a infecção é considerada um fator necessário, mas não suficiente para o desenvolvimento neoplásico. Nesse sentido, outros fatores que alteram o microambiente vaginal têm sido identificados por seu papel desempenhado na progressão da doença. (14) Esse fato é ainda ressaltado considerando o entendimento de que, a maior parte das mulheres irá se infectar com pelo menos um genótipo de HPV ao longo de sua vida, mas a ocorrência de persistência por genótipos de alto risco, a progressão de lesões precursoras e, o desenvolvimento neoplásico propriamente, ocorre somente em uma parcela dos indivíduos, ressaltando o papel desempenhado por outros co-fatores. (15, 16)

Além de fatores comportamentais, outros como dieta pobre em nutrientes, uso de contraceptivo hormonal de progesterona, e a presença de infecções sexualmente transmissíveis foram reportados como fatores associados à persistência viral. Mais recentemente, o papel desempenhado pela microbiota vaginal tem ganhado destaque em seu entendimento como fator associado à oncogênese do câncer cervical. (12, 13, 17-19)

Desta forma, estudos tem demonstrado que mulheres com disbioses vaginais possuem risco aumentado para a aquisição e persistência da infecção por HPV, bem como risco aumentado de progressão pré-neoplásica e neoplásica desse tipo de câncer. (15)

Por definição, a microbiota vaginal saudável é representada pelo predomínio de *Lactobacillus* spp. É reconhecido o papel protetor desempenhado por esta microbiota por meio de diversos mecanismos no ambiente vaginal. Dentre os fatores protetores mediados pela microbiota vaginal, destacam-se a manutenção do ambiente vaginal em pH ácido, especialmente através da produção de ácido láctico e peróxido de hidrogênio. (20) No mesmo sentido, a produção de bacteriocinas e biosurfactantes por determinadas espécies de lactobacilos auxiliam na manutenção de uma barreira mucosa íntegra e protetora contra a infecção por vírus e bactérias exógenas. De forma geral, tais mecanismos previnem o crescimento e adesão de outras bactérias oportunistas ao epitélio vaginal. (21-24)

Por outro lado, a presença de disbioses vaginais se configura como fator de risco para diversas complicações ginecológicas e obstétricas. Dentre as alterações de microbiota vaginal, em especial a vaginose bacteriana (VB) é associada a risco aumentado de abortos espontâneos e recorrentes, parto pré-termo, rotura prematura de membranas e maior susceptibilidade à aquisição de diversas infecções sexualmente transmissíveis (IST), dentre elas pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). (15, 21, 25)

No que se refere ao entendimento das disbioses vaginais como fator de risco para a aquisição de ISTs, atribui-se a maior susceptibilidade à perda dos mecanismos de proteção mediados por espécies lactobacilares. De forma geral, as disbioses vaginais estão associadas à uma falha na integridade da barreira mucosa, bem como associadas a um cenário inflamatório crônico e níveis

elevados de espécies reativas de oxigênio, demonstrando um contexto geral de estresse oxidativo. (15, 26, 27)

No que tange a associação entre disbioses vaginais, susceptibilidade à aquisição e persistência da infecção por HPV e o desenvolvimento displásico e neoplásico, reconhece-se que os capsídeos virais não são capazes de infectar o epitélio vaginal íntegro. Desta forma, a falha nos mecanismos protetores da barreira mucosa em condições disbióticas pode facilitar tal processo. (15, 26) Além disso, o cenário inflamatório crônico na mucosa pode ser considerado um fator favorável à carcinogênese induzida por HPV. (15, 28)

Um estudo recente que caracterizou o metaboloma vaginal de mulheres infectadas e não infectadas por HPV demonstra que, esse metaboloma vaginal não pode ser agrupado de acordo com o *status* da infecção pelo vírus, mas, paralelamente, pode ser agrupado de forma geral baseado na composição bacteriana desse ambiente. Perfis metabolômicos diferenciais são encontrados frente à infecção por HPV quando considerando um mesmo perfil de microbiota, em especial no que se refere aos metabólitos representativos de estresse oxidativo. (29)

Tendo em vista a compreensão de que as disbioses vaginais compreendem uma série de diversas alterações de microbiota, é importante ressaltar a vaginose bacteriana (VB), a mais prevalente entidade, acomete cerca de 30% da população feminina em idade reprodutiva. Por definição, a VB é caracterizada pela substituição total ou parcial das espécies de lactobacilos por grande diversidade de espécies bacterianas, em sua maioria anaeróbias. Dessa forma, a VB é considerada uma condição polimicrobiana, dada a grande quantidade de espécies a ela associadas e também à heterogeneidade com que se apresenta. (30)

Do ponto de vista clínico, os critérios de Amsel et al. (31) foram amplamente utilizados para o diagnóstico desta condição, baseado em quatro critérios: identificação de conteúdo vaginal fino e

homogêneo; pH vaginal acima de 4,5; identificação da presença de aminas voláteis quando em adição de hidróxido de potássio (*whiff test*); e identificação de células-pista (*clue cells*) à observação microscópica. Entretanto, a subjetividade atribuída a parte dos critérios imputava limitações aos critérios clínicos como metodologia diagnóstica.

No início da década de 90, Nugent et al. (32) propuseram um critério microscópico para diagnóstico da VB, amplamente utilizado e considerado padrão-ouro até os dias de hoje. O critério é baseado na classificação semi-quantitativa dos morfotipos presentes em esfregaços vaginais corados pelo método de Gram e classifica a microbiota vaginal em Flora I (escores 0 a 3), Flora Intermediária (escores 4 a 6) e Vaginose Bacteriana (escores 7 a 10).

Considerando a heterogeneidade intrínseca à VB, especialmente por seu caráter polimicrobiano por definição, o desenvolvimento de novos métodos moleculares para identificação bacteriana, especialmente através do sequenciamento de nova geração do gene bacteriano RNA ribossômico 16S, trouxe grande evolução na determinação da real composição bacteriana presente no ambiente vaginal pela caracterização de seu microbioma.

Nesse sentido, Ravel et al. (33) demonstraram que, apesar da grande diversidade bacteriana presente no ambiente vaginal, esse microbioma pode ser agrupado em 5 tipos de comunidades bacterianas, as denominadas *community-state types* (CSTs), conforme a predominância de determinadas espécies. Das 5 CSTs, 4 são caracterizadas pelo predomínio de espécies lactobacilares: *Lactobacillus crispatus* (CST I), *L. gasseri* (CST II), *L. iners* (CST III) e *L. jensenii* (CST V). Na comunidade bacteriana vaginal remanescente, a CST IV, o predomínio lactobacilar é substituído por aumento significativo na diversidade de espécies bacterianas de forma que não há predominância particular de nenhuma espécie. De fato, a maioria dos casos de VB detectada microscopicamente

encontra-se na CST IV, embora um número ainda considerável de casos de VB encontra-se distribuído nas demais CSTs, especialmente na CST III.

A compreensão microscópica e molecular da composição da microbiota vaginal permitiu a ampliação do entendimento da relação entre esse nicho e a infecção por HPV. Ainda, no que se refere à VB, já foi demonstrado que tal alteração da microbiota vaginal está associada à maior prevalência da infecção pelo HPV, já que alguns metabólitos dos microrganismos anaeróbios comprometem a resposta imune inata no ambiente vaginal conferindo tanto maior susceptibilidade à infecção, quanto a diminuição significativa na taxa do *clearance* viral. (34-37)

Brusselsaers et al. (15), em uma revisão sistemática e meta-análise recentemente publicada, baseada em estudos longitudinais que incluem a avaliação microscópica e molecular da microbiota, sugerem a ideia de uma associação causal entre disbioses vaginais e o câncer cervical ao longo da aquisição e persistência da infecção, bem como progressão displásica.

Paralelamente, Norenhag et al. (24), em revisão sistemática e meta-análise também recentemente publicada, baseada exclusivamente critérios moleculares para caracterização da microbiota, postulam que CSTs não dominadas por *Lactobacillus* spp. ou CSTs dominadas por *Lactobacillus iners* estão associadas a prevalências mais elevadas de infecção por HPV quando comparadas a comunidades dominadas por *L. crispatus*, associação encontrada tanto para qualquer genótipo de HPV quanto para genótipos de alto risco oncogênico. Nesse mesmo estudo os autores destacam que essa mesma associação é encontrada em casos de displasia e câncer do colo do útero.

A CST não dominada por *Lactobacillus spp* e a dominada por *L. iners* demonstraram de 3 a 5 vezes mais risco para a infecção por qualquer HPV e 2 a 3 vezes mais risco para a identificação de genótipos de alto risco oncogênico e displasia ou câncer cervical, quando comparados a comunidade dominada por *L. crispatus*. (24)

De forma geral, a compreensão do microbioma vaginal permitiu maior refinamento no entendimento da associação entre a composição microbiana e a infecção por HPV, inclusive através da identificação do papel desempenhado por diferentes espécies de *Lactobacillus spp* frente à infecção. Esse entendimento ressalta, também, a possibilidade de compreensão mais profunda das relações estabelecidas por determinadas espécies bacterianas e o HPV, em especial tendo em vista a heterogeneidade intrínseca da microbiota, em especial nos casos de VB e CST IV.

Desta forma, a ideia de uma associação entre determinadas espécies bacterianas e a infecção por HPV, em especial os de alto risco oncogênico, tem sido proposta recentemente. (38)

De forma pontual, *Fusobacterium spp.* tem sido proposto por seu papel como possível facilitador oncogênico e sua associação ao desenvolvimento displásico, (9,20 – 44) em especial de forma paralela aos entendimentos do microbioma intestinal e o papel desempenhado por essa bactéria no câncer colorretal. (24, 39-41)

Paralelamente, as espécies *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium vaginae* foram propostos como possíveis marcadores moleculares, considerando o fato de ambos contribuírem para a formação de biofilmes, em especial pelo papel que esta formação pode desempenhar na persistência do HPV. (24, 42-45)

Similarmente, uma associação foi descrita associação entre genótipos de alto risco oncogênico e a abundância de *Prevotella spp.* e *Leptotrichia spp.* (46), enquanto *Snethia spp.* foi descrita por seu possível papel na carcinogênese cervical (47) e reportado como possível marcador para infecções por HPV de alto risco oncogênico. (21)

Adicionalmente, determinadas espécies, dentre elas *Atopobium spp.* (que não *A. vaginae*), *Dialister spp.*, *Eggerthella spp.*, *Gemella spp.* e *Gardnerella spp.*, foram encontradas de forma mais

abundante em mulheres com infecção por HPV classificadas com CST IV, bem como concordantes com a presença de determinadas aminos biogênicas após avaliação metabólica. (29)

De forma geral, o emergente entendimento da associação entre determinadas espécies e a infecção viral é um campo promissor na identificação de possíveis marcadores biológicos, em especial por seu potencial de aplicação clínica. A identificação de mulheres com determinadas composições microbianas pode direcionar abordagens de seguimento e manejo diferenciais do ponto de vista clínico frente à infecção por HPV.

Embora causalidade não tenha sido determinada entre componentes microbianos e a persistência e progressão de lesões HPV-induzidas, em especial pelos fatores confundidores associados à composição da microbiota, é relevante ressaltar que a composição microbiana é um fator de risco potencialmente modificável. (15)

Nesse sentido, é relevante ressaltar alguns dos diversos fatores que influenciam a composição da microbiota e que impõem algumas limitações ao completo entendimento da relação microbiota – HPV. São fatores inerentes ao hospedeiro: idade, *status* hormonal, fatores sociodemográficos, fatores comportamentais e sexuais, etnia, bem como fatores genéticos associados, presença de coinfeções, entre outros. Paralelamente, a heterogeneidade associada e classificações diferenciais da microbiota entre estudos são outros fatores confundidores que permeiam a complexidade desse entendimento. (15, 24)

Apesar dessas limitações, estudos reiteram o papel desempenhado pela microbiota na persistência da infecção e no desenvolvimento do câncer cervical. Nesse aspecto, é importante ressaltar o papel do manejo das disbioses em favor do estabelecimento de um ambiente lactobacilar como um fator de intervenção no controle das alterações HPV-induzidas no colo uterino. É relevante

o potencial de tais intervenções como uma possível ferramenta auxiliar na redução de procedimentos ablativos e excisionais na prática ginecológica. (15)

As disbioses vaginais são ainda pouco estudadas e devidamente diagnósticas, tendo em vista seu papel como fator de risco na epidemiologia do HPV. A avaliação e manejo das disbioses, associadas a estratégias vacinais, possivelmente contribuiriam significativamente na redução do câncer cervical. (15)

Referências

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424.
2. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:F55-78.
3. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
4. Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003:3-13.
5. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007;121:621-32.
6. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002;89:213-28.
7. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63:1129-36.
8. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989;8:4099-105.
9. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006;118:3030-44.
10. Dalton-Griffin L, Kellam P. Infectious causes of cancer and their detection. *J Biol* 2009;8:67.
11. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.

12. Luckett R, Feldman S. Impact of 2-, 4- and 9-valent HPV vaccines on morbidity and mortality from cervical cancer. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12:1332-42.
13. Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, Herrero R, Bray F, Bosch FX, et al. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. *Lancet Glob Health* 2016;4:e453-63.
14. Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Téllez-Sosa J, Martínez-Barnetche J, Cortina-Ceballos B, et al. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS One* 2016;11:e0153274.
15. Brusselaers N, Shrestha S, van de Wijgert J, Verstraelen H. Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2019;221:9-18.e8.
16. Sudenga SL, Shrestha S. Key considerations and current perspectives of epidemiological studies on human papillomavirus persistence, the intermediate phenotype to cervical cancer. *Int J Infect Dis* 2013;17:e216-20.
17. Ginindza TG, Dlamini X, Almonte M, Herrero R, Jolly PE, Tsoka-Gwegweni JM, et al. Prevalence of and Associated Risk Factors for High Risk Human Papillomavirus among Sexually Active Women, Swaziland. *PLoS One* 2017;12:e0170189.
18. Bogani G, Taverna F, Lombardo C, Borghi C, Martinelli F, Signorelli M, et al. Retrospective study of the influence of HPV persistence on outcomes among women with high-risk HPV infections and negative cytology. *Int J Gynaecol Obstet* 2017;138:62-8.
19. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 2003;158:486-94.
20. Graver MA, Wade JJ. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2011;10:8.
21. Lee JE, Lee S, Lee H, Song YM, Lee K, Han MJ, et al. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. *PLoS One* 2013;8:e63514.
22. Boris S, Barbés C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect* 2000;2:543-6.
23. Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA, et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:375-9.
24. Norenhag J, Du J, Olovsson M, Verstraelen H, Engstrand L, Brusselaers N. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis. *BJOG* 2019.
25. Unemo M, Bradshaw CS, Hocking JS, de Vries HJC, Francis SC, Mabey D, et al. Sexually transmitted infections: challenges ahead. *Lancet Infect Dis* 2017;17:e235-e79.
26. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13:800-12.
27. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science* 2015;348:80-6.
28. Fernandes JV, DE Medeiros Fernandes TA, DE Azevedo JC, Cobucci RN, DE Carvalho MG, Andrade VS, et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). *Oncol Lett* 2015;9:1015-26.
29. Borgogna JC, Shardell MD, Santori EK, Nelson TM, Rath JM, Glover ED, et al. The vaginal metabolome and microbiota of cervical HPV-positive and HPV-negative women: a cross-sectional analysis. *BJOG* 2020;127:182-92.

30. Mitchell C, Marrazzo J. Bacterial vaginosis and the cervicovaginal immune response. *Am J Reprod Immunol* 2014;71:555-63.
31. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983;74:14-22.
32. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991;29:297-301.
33. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108 Suppl 1:4680-7.
34. Watts DH, Fazzari M, Fazzari M, Minkoff H, Hillier SL, Sha B, et al. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. *J Infect Dis* 2005;191:1129-39.
35. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2011;11:10.
36. King CC, Jamieson DJ, Wiener J, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo AM, et al. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011;2011:319460.
37. Guo YL, You K, Qiao J, Zhao YM, Geng L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *Int J STD AIDS* 2012;23:581-4.
38. Huang X, Li C, Li F, Zhao J, Wan X, Wang K. Cervicovaginal microbiota composition correlates with the acquisition of high-risk human papillomavirus types. *Int J Cancer* 2018;143:621-34.
39. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, et al. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One* 2011;6:e20447.
40. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 2013;14:207-15.
41. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*. 2013;342:971-6.
42. Di Paola M, Sani C, Clemente AM, Iossa A, Perissi E, Castronovo G, et al. Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Sci Rep* 2017;7:10200.
43. Machado A, Cerca N. Influence of Biofilm Formation by *Gardnerella vaginalis* and Other Anaerobes on Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis* 2015;212:1856-61.
44. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 2005;106:1013-23.
45. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Mendling W, Dörffel Y, Schilling J, Halwani Z, et al. Infection through structured polymicrobial *Gardnerella* biofilms (StPM-GB). *Histol Histopathol* 2014;29:567-87.
46. Dareng EO, Ma B, Famooto AO, Adebamowo SN, Offiong RA, Olaniyan O, et al. Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women. *Epidemiol Infect* 2016;144:123-37.

47. Łaniewski P, Barnes D, Goulder A, Cui H, Roe DJ, Chase DM, et al. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women. *Sci Rep* 2018;8:7593.