

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 11/04/2024.



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

JULIANO NOVAK

**Aspectos da microbiota vaginal relacionados à resposta
inflamatória local e infecção pelo papilomavírus humano**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

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

BOTUCATU

2023

Juliano Novak

**Aspectos da microbiota vaginal relacionados à resposta
inflamatória local e infecção pelo papilomavírus humano**

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título
de Doutor em Patologia.

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

Botucatu
2023

N935a	Novak, Juliano Aspectos da microbiota vaginal relacionados à resposta inflamatória local e infecção pelo papilomavírus humano / Juliano Novak. -- , 2023 92 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu, Orientadora: Camila Marconi Coorientadora: Márcia Guimarães da Silva 1. Microbiota vaginal. 2. Citocinas. 3. Vaginose bacteriana. 4. Infecções sexualmente transmissíveis. 5. Papilomavírus humano. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

*Dedico este trabalho a minha mãe Elvira,
por seu exemplo de vida.*

Agradecimentos

À **minha família** por todo o apoio recebido durante a realização deste trabalho.

Aos **amigos** que estão sempre presente e que nos incentivam na busca por nossos objetivos.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Camila Marconi**, por toda a confiança no meu trabalho ao longo desses anos e por toda a contribuição científica e apoio, que possibilitaram a realização deste e outros trabalhos durante a iniciação científica e pós-graduação.

À Profa. **Dra. Márcia Guimarães**, por ter aberto as portas do seu laboratório desde a iniciação científica. Além de toda a contribuição, ensinamentos e oportunidades oferecidas ao longo destes anos.

À toda equipe do **Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal** pelo apoio durante todos estes anos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Patologia** pelo apoio durante o doutorado e à **UNIPLEX**, onde este trabalho foi realizado.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia, **Vânia Soler**, por ser sempre solícita.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq), pela bolsa de doutorado, essencial para realização deste trabalho.

RESUMO

A microbiota vaginal normal é composta por espécies de *Lactobacillus* que, principalmente devido a capacidade de produção de ácido láctico, conferem um ambiente protetor contra as infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), incluindo pelo papilomavírus humano (HPV), que é a IST mais prevalente mundialmente. Quando há substituição de *Lactobacillus* spp. por espécies anaeróbias e facultativas como *Gardnerella vaginalis*, *Fannyhessea vaginae*, *Prevotella* spp. entre outras, tem-se uma condição conhecida como vaginose bacteriana (VB). A microbiota vaginal pode ser classificada molecularmente, de acordo com o perfil dos genes bacterianos codificantes do RNA ribossômico 16S em cinco tipos de comunidades bacterianas (CSTs, do inglês *community-state types*) após sequenciamento. Em quatro CSTs, observa-se o predomínio de *Lactobacillus* spp., sendo: *L. crispatus* a espécie dominante na CST I, *L. gasseri* na CST II, *L. iners* na CST III e *L. jensenii* na CST V. Na CST IV, observa-se a depleção de *Lactobacillus*, acompanhada por uma microbiota diversa, com abundância de espécies anaeróbias e facultativas, compreendendo a maioria dos casos de VB. Na VB, observa-se o aumento dos níveis cérvico-vaginais de citocinas inflamatórias e de produtos bacterianos, como as sialidases. Tais alterações nos componentes cérvico-vaginais reduzem a capacidade de proteção da barreira física e imunológica local. Portanto, alinhado ao objetivo de correlacionar os parâmetros da microbiota vaginal e os níveis de citocinas no ambiente cérvico-vaginal nas diferentes CSTs vaginais, foi verificado que, em geral, a CST II apresenta um perfil distinto de correlações, principalmente entre carga bacteriana e citocinas, quando comparado às outras CSTs dominadas por *Lactobacillus* (CST I e CST III). Embora os mecanismos pelos quais a VB contribua para a aquisição e persistência de ISTs não sejam completamente elucidados, acredita-se que o aumento das sialidases bacterianas locais esteja envolvido. Neste sentido, objetivou-se comparar as cargas do gene nanH3 que codifica a sialidase

de *Gardnerella* spp. no fluido cérvico-vaginal de mulheres com persistência da infecção pelo HPV de alto risco oncogênico (hrHPV, do inglês high-oncogenic risk HPV) e aquelas que eliminaram a infecção (*clearance*) após 12 meses. Observou-se que, embora não haja diferença na carga de nanH3 entre os grupos com persistência e *clearance* de hrHPV, quando considerado apenas o genótipo HPV16, a carga de nanH3 é significativamente maior em mulheres com a persistência viral. Portanto, a classificação molecular da microbiota vaginal e a correlação dos parâmetros microbiológicos com citocinas permitem o melhor entendimento nos mecanismos envolvidos na relação entre a microbiota vaginal e a maior vulnerabilidade às ISTs. Além disso, a identificação de fatores de virulência bacterianos, como as sialidases, produzidos por componentes da microbiota vaginal alterada poderá contribuir para a identificação de preditores da microbiota associados à persistência de ISTs, como o HPV e as lesões HPV-induzidas.

Palavras-chave: Microbiota vaginal; citocinas; sialidases, infecções sexualmente transmissíveis; papilomavírus humano.

ABSTRACT

The normal vaginal microbiota is dominated by *Lactobacillus* spp. that, mainly due the capacity lactic acid production, provide an acidified and protective environment against changes in the microbiota and the acquisition of sexually transmitted infections (STIs). The shift of *Lactobacillus* spp. by anaerobic and facultative species such as *Gardnerella vaginalis*, *Fannyhessea vaginae*, *Prevotella* sp. among others, leads to a condition known as bacterial vaginosis (BV). Molecularly, the vaginal microbiota may be classified into five community-state type (CST) by sequencing the bacterial 16S rRNA gene. In four CSTs is observed predominance of *Lactobacillus* sp.: *L. crispatus* (CST I), *L. gasseri* (CST II), *L. iners* (CST III) and *L. jensenii* (CST V), while CST IV is classified as a diverse microbiota, with an abundance of anaerobic and facultative anaerobic species, comprising most cases of BV. In BV, there is an increase in cervicovaginal levels of inflammatory cytokines and bacterial products, such as sialidases. Such alterations in the cervicovaginal components reduce the protective capacity of the local physical and immunological barrier. Therefore, in line with the objective of correlating the parameters of the vaginal microbiota and the levels of cytokines in the cervicovaginal environment in the different CSTs, it was verified that, in general, CST II presents a distinct profile of correlations, mainly between bacterial load and cytokines, when compared to the CST I and III, both dominated by *Lactobacillus* spp. Although the mechanisms by which BV contributes to the acquisition and persistence of STIs are not fully elucidated, it is believed that the increase in sialidase production are involved. In this sense, it was aimed comparing the loads of the *Gardnerella* sialidase encoding-gene (nanH3) in the cervicovaginal fluid of women with persistent infection by high-risk oncogenic HPV (hrHPV) and those who cleared the infection after 12 months. It was observed no difference in the load of nanH3 between the clearance and persistence groups when considering infection by all hrHPV genotypes, however, the

nanH3 loads is significantly higher in women with HPV16 persistent infection. Therefore, the molecular classification of the vaginal microbiota and their correlation with cytokines allow a better understanding the mechanisms involved in the relationship between the vaginal microbiota and greater vulnerability to STIs. Furthermore, the identification of bacterial virulence factors, such as sialidases, produced by components of the disturbed vaginal microbiota may contribute to the identification of microbiota predictors associated with the persistence of STIs, such as HPV and HPV-induced lesions.

Keywords: Vaginal microbiota; cytokines; sialidase; sexually transmitted infections; human papillomavirus.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
REVISÃO DE LITERATURA	12
1.MICROBIOTA VAGINAL	13
2.MICROBIOTA VAGINAL E INFLAMAÇÃO	16
3.INFEÇÃO PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO	18
4.BIOLOGIA DO VÍRUS E PATOGÊNESE VIRAL	20
5.FATORES ASSOCIADOS À PERSISTÊNCIA OU <i>CLEARANCE</i> DO HPV	25
6.MICROBIOTA VAGINAL E HPV	26
7.REFERÊNCIAS.....	28
8. OBJETIVO	38
CAPÍTULO II	39
ARTIGO CIENTÍFICO I	39
Covariates of vaginal microbiota and pro-inflammatory cytokines levels in women of reproductive age.....	40
1. INTRODUCTION.....	41
2. MATERIALS AND METHODS.....	41
2.1. Population and sampling procedures	42
2.2. Study design and selection of participants	42
2.3. Microbiota diversity, richness and taxa relative abundances	43
2.4. Assessment of total bacterial load	43
2.5. Cervicovaginal levels of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF-a.....	44
2.6. Statistical Analysis.....	44
3. RESULTS.....	45

4. DISCUSSION	50
5. REFERENCES	54
6. SUPPLEMENTARY MATERIAL	59
CAPÍTULO III	62
ARTIGO CIENTÍFICO II	62
Cervicovaginal <i>Gardnerella</i> sialidase-encoding gene in persistent human papillomavirus infection	63
1.INTRODUCTION	64
2.RESULTS	65
3.DISCUSSION	71
4.METHODS	74
4.1.Data collection, sampling and laboratorial procedures	74
4.2.Selection of participants and group assignments	76
4.3.Statistical analysis	77
5. REFERENCES	78
6.SUPPLEMENTARY MATERIAL	84
CAPÍTULO IV	85
CONCLUSÕES	86
ANEXOS	86

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. MICROBIOTA VAGINAL

A microbiota vaginal saudável apresenta predomínio de espécies do gênero *Lactobacillus* sp. [1] e a comunidade científica tem constantemente confirmado a importância da colonização por tais microrganismos [2] uma vez que estes são responsáveis pela manutenção do ambiente vaginal equilibrado além de conferir defesa contra patógenos [3]. Tal capacidade protetiva se deve à capacidade dos *Lactobacillus* sp. em produzir ácido láctico utilizando o metabolismo do glicogênio armazenado nas células epiteliais vaginais, bem como produção de peróxido de hidrogênio e bacteriocinas [4-7]. Neste sentido, a literatura tem sido consistente ao demonstrar que mulheres com predomínio de *Lactobacillus* sp. apresentam menor risco de aquisição de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), sejam estas bacterianas, como *Chlamydia trachomatis* ou *Neisseria gonorrhoeae*, ou infecções virais, como pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e papilomavírus humano (HPV) [3, 8, 9].

Diferentemente da microbiota vaginal saudável, na vaginose bacteriana (VB), principal disbiose da microbiota vaginal, há uma depleção parcial ou total dos *Lactobacillus* sp. Tais espécies são substituídas por outras como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Atopobium vaginae* (atualmente renomeada para *Fannyhessea vaginae* [10]), entre outras [11]. Trata-se de uma condição que apresenta uma prevalência próxima a 30% nas mulheres em idade reprodutiva, sendo tal prevalência compatível com a encontrada no Brasil, embora possa variar de acordo com algumas características populacionais como idade, etnia e características comportamentais [11, 12]. Deste modo, os estudos já demonstraram que a VB está associada a fatores como comportamento sexual, incluindo histórico de mais de um parceiro sexual na vida, relato de novo parceiro sexual ou início de atividade sexual em idade mais jovem, além do uso de duchas vaginais e estresse crônico [12].

A VB está associada à diversas complicações obstétricas e ginecológicas, levando a efeitos deletérios para a saúde, visto que, mulheres que apresentam essa alteração de microbiota têm risco aumentado para aquisição e transmissão de ISTs, como por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, HIV e HPV [13-17]. Além disso, no contexto da infecção pelo HPV, já foi demonstrado que a VB aumenta o tempo de *clearance* viral [18].

Para o diagnóstico da VB, a partir do estabelecido por Nugent et al. (1991), leva-se em conta a observação microscópica dos morfotipos bacterianos presentes no esfregaço do conteúdo vaginal após coloração pela técnica de Gram, sendo este o padrão-ouro para o diagnóstico [19]. Desta forma, baseando-se na semiquantificação dos morfotipos presentes, são atribuídos escores de 0 a 10, onde a microbiota normal recebe escores de 0 a 3, a intermediária de 4 a 6 e escores superiores são compatíveis com VB [19]. Clinicamente, as queixas mais relatadas são o aumento do conteúdo vaginal associado à um mau odor genital intenso, embora cerca de 50% dos casos sejam oligo- ou assintomáticos [12]. Deste modo, os critérios de Amsel são usados para diagnosticar a VB na maioria dos ambientes clínicos e levam em consideração a avaliação do pH vaginal, uma vez que na falta de *Lactobacillus*, este está aumentado (>4,5), a presença de corrimento vaginal, o aparecimento de *clue cells* (células epiteliais vaginais descamadas repletas de bactérias anaeróbias) e um *whiff-test* positivo, ou seja, percepção de um odor característico de “peixe” ao adicionar 10% de hidróxido de potássio à uma lâmina microscópica contendo o conteúdo vaginal [7].

Molecularmente, a vasta maioria dos casos de VB está inserida dentro da comunidade bacteriana que apresenta aumento da diversidade bacteriana conforme descrito por Ravel et al. (2011) [20]. Neste sentido, graças à evolução dos métodos moleculares para identificação bacteriana, como as técnicas de sequenciamento de nova geração, tais autores demonstraram

que, independentemente da grande diversidade do microbioma vaginal, ele pode ser classificado em cinco principais tipos de comunidades (*community-state type*, CST), conforme a predominância de determinadas espécies. Assim, quatro destas CSTs apresentam predomínio de *Lactobacillus*: CST I (*L. crispatus*), CST II (*L. gasseri*), CST III (*L. iners*) e CST V (*L. jensenii*). Já a CST IV apresenta grande diversidade bacteriana, sendo a *Gardnerella* sp. encontrada em abundância nesta CST, além de *F. vaginae*, *Prevotella* sp., entre outros [20]. No Brasil, nosso grupo de pesquisa caracterizou o microbioma vaginal de mulheres em idade reprodutiva das cinco regiões do país e revelou que 96% das mulheres brasileiras apresentam microbioma vaginal pertencente somente às CST I, CST III e CST IV, sendo que quase 30% das mulheres estão incluídas na CST IV [21].

Tais CSTs, mesmo que com predomínio lactobacilar, podem diferir em alguns aspectos, uma vez que cada espécie lactobacilar possui características particulares em relação a produção de fatores protetores, como por exemplo, a produção de ácido láctico [22]. Em termos de estabilidade, autores apontam que a CST com predomínio de *L. iners* é mais instável e pode variar com relação à variedade de outras espécies coabitando o mesmo ambiente, enquanto que as comunidades com predomínio de *L. crispatus* e *L. gasseri* tendem a ser mais estáveis ao longo do tempo [9, 23]. Em relação às características da população associadas às CSTs, nosso grupo de estudo demonstrou recentemente que o hábito de fumar, o número de parceiros sexuais e ducha vaginal estão associados à CST IV [21], enquanto que a CST III foi independentemente associada às características da população anteriormente associadas à VB como baixa escolaridade, múltiplos parceiros sexuais e sexo desprotegido [24]. Deste modo, podemos observar que características sociodemográficas e comportamentais são associadas à composição da microbiota vaginal e tal composição parece

ter papel relevante na manutenção de um microambiente vaginal saudável, reduzindo inclusive a ocorrência de ISTs, embora os mecanismos pelos quais as alterações de microbiota, como a VB, favoreça a aquisição e persistência de ISTs não sejam totalmente compreendidos, acredita-se que a resposta inflamatória esteja envolvida [15].

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO

CONCLUSÕES

Embora a microbiota vaginal desempenhe um importante papel na manutenção de um microambiente vaginal saudável, quando esta é predominada por *L. gasseri* parece demonstrar um perfil de carga bacteriana e correlação entre fatores microbiológicos e citocinas distinto das demais comunidades com predomínio de outras espécies de *Lactobacillus*. Portanto, é de suma importância considerar que a interação e carga bacteriana são fatores importantes, uma vez que até mesmo uma microbiota com predomínio lactobacilar pode apresentar um perfil imunológico distinto. Neste sentido, destaca-se a importância em estudar as interações entre espécies bacterianas consideradas como fator chave no desencadeamento de resposta inflamatória, uma vez que as respostas inflamatórias podem contribuir para a aquisição de ISTs.

As cargas do gene *nanH3* codificante da sialidase de *Gardnerella* sp. no lavado cérvico-vaginal não apresentaram diferença entre mulheres com infecção persistente por hrHPV e aquelas que tiveram *clearance* após 12 meses. No entanto, ao considerar apenas o genótipo do HPV16, as cargas de *nanH3* foram maiores no grupo com persistência, sendo importante a elucidação da interação entre os diferentes genótipos de HPV e componentes da microbiota vaginal.