

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
tese será disponibilizado  
somente a partir de 23/02/2026.



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

**Rafael Belleti**

**Composição taxonômica e potencial funcional do  
microbioma vaginal e relação com o papilomavírus  
humano em mulheres brasileiras**

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

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

**Botucatu  
2024**

Rafael Belleti

Composição taxonômica e potencial funcional do  
microbioma vaginal e relação com o  
papilomavírus humano em mulheres brasileiras

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

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

Botucatu  
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Belleti, Rafael.

Análise da composição e função da microbiota vaginal e relação com o papilomavírus humano em mulheres brasileiras / Rafael Belleti. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Camila Marcon

Coorientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40105008


1. *Papillomaviridae*. 2. Metagenômica. 3. Microbiota. 4. Vagina - Doenças.

Palavras-chave: HPV; Metagenômica; Microbioma vaginal; Papilomavirus humano.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE RAFAEL BELLETI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.**

Aos 23 dias do mês de agosto do ano de 2024, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de RAFAEL BELLETI, intitulada **Análise da composição e função da microbiota vaginal e relação com o papilomavírus humano em mulheres brasileiras**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. CAMILA MARCON (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto. de Patologia Básica / Universidade Federal do Paraná , Profa. Dra. RITA MAIRA ZANINE (Participação Virtual) do(a) Depto. de Tocoginecologia / Universidade Federal do Paraná , Profa. Dra. ALINE DO NASCIMENTO BOLPET (Participação Virtual) do(a) Universidade Nove de Julho (Uninove) / Bauru, Profa. Dra. MICHELLE GARCIA DISCACCIATI DE CARVALHO (Participação Virtual) do(a) Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - CAISM/Campinas - Unicamp, Profa. Dra. ANA KATHERINE DA SILVEIRA GONÇALVES (Participação Virtual) do(a) Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. CAMILA MARCON

Documento assinado digitalmente  
 CAMILA MARCON  
Data: 27/08/2024 12:55:13-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dedicatória**

---

Dedico esse trabalho aos meus pais, Danistela e Julio, pelo apoio incondicional e por tudo sempre.

Ao meu irmão Bruno pelo companheirismo por toda vida.

E a minha vó, Yara, por todo amor e zelo.

*“Hoje eu queria muito agradecer a mim, porque eu não desisti.”*  
(Anitta)

## **Agradecimientos**

---

À **Deus**, pelas bênçãos por todo o caminho até aqui.

Aos meus pais, **Júlio e Danistela**, pela presença constante e por sempre me apoiar em todas as decisões e principalmente pela parceria nesses últimos anos. Sou grato a todas as oportunidades que vocês lutaram muito para me oferecer.

Ao meu irmão **Bruno** pela amizade e parceria de sempre. Valeu Tato!

A minha orientadora **Camila Marcon**, por todo suporte e parceria nesses quase 7 anos. Foi muito bom ter uma pesquisadora de alto nível comigo nessa caminhada. E também agradeço pelo apoio e pelas oportunidades que me foram proporcionadas.

A minha coorientadora **Márcia Guimarães da Silva**, pelo exemplo profissional de por ter me acolhido nesses últimos 8 anos no laboratório. Devo parte da minha formação a senhora.

À **Jeniffer** (Guenta), por ser um dos seres humanos mais especiais que poderia conhecer. Obrigado por estar do meu lado e por dividirmos o mesmo neurônio.

À **Giovana** (Tucu), que é um presente que a pós-graduação me trouxe. Amiga, obrigado pela parceria, companhia e por ter feito esse período muito divertido. Sempre ótimo rir com você.

À **Mariana** (Murta), pela amizade, sensibilidade e apoio nesses quase 10 anos. Você é um exemplo de profissional.

Ao meu amigo **Carlos**, por toda a parceria e amizade nesses anos. Obrigado por ser tão maravilhoso e por toda ajuda nesses últimos anos comigo e com minha família. Você é uma das pessoas mais especiais pra mim.

Ao meu namorado, **José**, pelo companheirismo, carinho e apoio principalmente nessa reta final. Muito bom ter um porto seguro, poder crescer e partilhar desse momento ao seu lado.

Aos meus amigos da faculdade, **Everson** (Rolê) e **Daniel** (Coisinha), por toda amizade sempre.

À **Júlia** (Seri), **Alessandra** (Piga) e **Bárbara** (Mafa) que fazem parte dos melhores presentes que Botucatu poderia me dar. Amo vocês com todo meu coração.

A minha amiga de intercâmbio, **Luana**, pelo prazer de ter conhecido uma irmã que foi muito importante, que fez meu ano ser muito melhor topando sempre tomar uma cervejinha comigo. A-LE-GRI-A.

À **Larissa** (Mams), que para além do laboratório se tornou uma amiga pra vida toda.

Aos amigos de Mirassol, **Bárbara** e **Bruno**. Obrigado pela amizade, amo vocês.

Obrigado por todo apoio e ensinamentos na profissão e na vida.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-fetal: **Guilherme, Rafael,**

**Marina, Maria Eduarda, Luiza, Ana e Laura.** Aos novos pupilos da ciência, muito obrigado pela companhia e por fazerem o ambiente de trabalho mais leve.

À secretária da Pós-graduação, **Vânia**, pela ajuda em todas as documentações e burocracias no decorrer desse tempo.

To **Jacques Ravel**, for the opportunity and all the support at University of Maryland (UMB) for the past year.

To my Baltimore friends, **Brad, Megan and Bern** for all the fun and company. You guys made my year so much better.

A todos os meus professores, principalmente os do ensino básico, que me ensinaram até aqui. Vocês foram essenciais para minha formação e com certeza ajudaram na construção da pessoa que sou hoje. Sem vocês nada disso seria possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e ao pela bolsas concedidas (processos 88887.481120/2020-00 e 88887.696603/2022-00) durante esse período.

**Resumo**

---

**Introdução:** Estudos sobre o microbioma vaginal são fundamentais para entender como este microambiente contribui para a saúde das mulheres. Utilizando dados metagenômicos, como VALENCIA e o classificador de CST metagenômico (mgCST), as recentes classificações dos tipos de comunidade (CSTs) do microbioma vaginal têm fornecido importantes caracterizações do microbioma vaginal. No Brasil, os estudos de composição do microbioma são escassos, mas já foi apontado altas prevalências de CST IV, caracterizado pela depleção de *Lactobacillus* spp.. A CST IV engloba a maioria dos casos de vaginose bacteriana (VB), que é a principal disbiose encontrada na microbiota vaginal. Esta disbiose já foi previamente associada à diversas infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), como a persistência do papilomavírus humano de alto risco (hrHPV). No entanto, o mecanismo envolvido nesta associação não está elucidado. *Gardnerella* spp., *Fannyhessea vaginae* e *Prevotella bivia* são apontados como espécies importantes na patogênese da VB. Por isso, o objetivo foi a caracterização taxonômica e potencial funciona do microbioma vaginal e relação com o papilomavírus humano em mulheres brasileiras.

**Metodologia:** De um total de 609 mulheres em idade reprodutiva incluídas em um estudo anterior que caracterizou o microbioma vaginal com base em sequências de 16S rRNA, 254 amostras vaginais foram selecionadas aleatoriamente para a análise metagenômica atual. Dados sociodemográficos, comportamentais e clínicos foram avaliados através de questionário e as amostras foram analisadas quanto ao pH vaginal, escores de Nugent do conteúdo vaginal e presença de infecções sexualmente transmissíveis como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*. Para a análise de cargas bacterianas envolvidas na VB, foram incluídas 216 mulheres positivas para hrHPV de um estudo anterior que incluía 1638 mulheres em idade reprodutiva. As cargas bacterianas de *Gardnerella* spp., *F. vaginae* e *P. bivia* basais foram realizadas através de *Real Time-PCR* e comparadas entre os grupos de 'persistência' e 'clearance', categorizados com base no status do HPV no recrutamento e no acompanhamento após 12 e 24 meses.

**Resultados:** As análises revelaram que a CST I, dominado por *L. crispatus*, representou 31.1% das participantes, a CST III, dominado por *L. iners*, 31.9%, e a CST IV, uma comunidade com uma diversidade de espécies, 33.8%. *L. crispatus* mgCST 1 foi a mais frequente (23.4%), seguido por *L. iners* mgCST 12 (15.0%) e *G. vaginalis* mgCST 20 (8.7%) e 24 (9.0%). As mgCSTs de *G. vaginalis* foram tiveram

maior frequência de maior número de parceiros sexuais/ano, aumento do pH vaginal e escores de Nugent mais elevados, sugerindo que fatores comportamentais e clínicos poderiam estar associados a essas mgCSTs.

*Gardnerella* spp. exibiu cargas significativamente maiores no grupo persistência (3.20E05 cópias/ $\mu$ L) em comparação ao grupo de eliminação (2.15E04 cópias/ $\mu$ L), indicando seu potencial efeito negativo na eliminação do hrHPV após 12 meses. No entanto, *F. vaginae* e *P. bivia* não mostraram associação significativa com a persistência do hrHPV.

**Conclusão:** O estudo fornece uma nova caracterização metagenômica do microbioma vaginal brasileiro e mostra que componentes microbianos e comportamentais podem influenciar tanto a manutenção do ambiente vaginal saudável, como também a persistência de infecções por HPV de alto risco.

Palavras-chave: Microbioma; microbiota vaginal; CST; metagenômica; papilomavírus humano; *Gardnerella*; *Fannyhessea vaginae*; *Prevotella bivia*.

**Abstract**

---

**Introduction:** Studies on the vaginal microbiome are essential for understanding how this microenvironment contributes to women's health. Utilizing metagenomic data, such as VALENCIA and the metagenomic CST classifier (mgCST), recent classifications of the community-state types (CSTs) of the vaginal microbiome have provided important characterizations of the vaginal microbiota. In Brazil, studies on microbiome composition are scarce, but high prevalence rates of CST IV, characterized by the depletion of *Lactobacillus* spp., have already been reported. CST IV encompasses the majority of bacterial vaginosis (BV) cases, which is the main dysbiosis found in the vaginal microbiota. This dysbiosis has been previously associated with several sexually transmitted infections (STIs), such as the persistence of high-risk human papillomavirus (hrHPV). However, the mechanism involved in this association is not yet elucidated. *Gardnerella* spp., *Fannyhessea vaginae*, and *Prevotella bivia* are pointed out as important species in the pathogenesis of BV. Therefore, the first objective was to characterize the vaginal microbiome with different metagenomic approaches (VALENCIA and the mgCST classifier) among Brazilian women and to investigate sociodemographic, behavioral, and clinical variables associated with communities dominated by *L. crispatus*, *L. iners*, and *Gardnerella vaginalis*. Secondly, to compare the cervicovaginal loads of *Gardnerella* spp., *F. vaginae*, and *P. bivia* between women with persistent hrHPV infection and those who cleared the infection after 12 and 24 months.

**Methods:** From a total of 609 reproductive-aged women included in a previous study that characterized the vaginal microbiome based on 16S rRNA sequences, 254 vaginal samples were randomly selected for the current metagenomic analysis. Sociodemographic, behavioral, and clinical data were evaluated through a questionnaire, and the samples were analyzed for vaginal pH, Nugent scores of vaginal content, and the presence of sexually transmitted infections such as *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis*. For the analysis of bacterial loads involved in BV, 216 hrHPV-positive women from a previous study that included 1638 reproductive-aged women were included. Basal bacterial loads of *Gardnerella* spp., *F. vaginae*, and *P. bivia* were performed using Real Time-PCR and compared between the 'persistence' and 'clearance' groups, categorized based on HPV status at enrollment and follow-up after 12 and 24 months.

**Results:** The analyses revealed that CST I, dominated by *L. crispatus*, represented

31.1% of the participants, CST III, dominated by *L. iners*, 31.9%, and CST IV, a community with a diversity of species, 33.8%. *L. crispatus* mgCST 1 was the most frequent (23.4%), followed by *L. iners* mgCST 12 (15.0%) and *G. vaginalis* mgCST 20 (8.7%) and 24 (9.0%). *G. vaginalis* mgCSTs were associated with a higher frequency of multiple sexual partners per year, increased vaginal pH, and higher Nugent scores, suggesting that behavioral and clinical factors could be associated with these mgCSTs. *Gardnerella* spp. exhibited significantly higher loads in the persistence group (3.20E05 copies/ $\mu$ L) compared to the clearance group (2.15E04 copies/ $\mu$ L), indicating its potential negative effect on the clearance of hrHPV after 12 months. However, *F. vaginae* and *P. bivia* did not show a significant association with hrHPV persistence.

**Conclusion:** This study provides a new metagenomic characterization of the Brazilian vaginal microbiome and shows that microbial and behavioral components can influence both the maintenance of a healthy vaginal environment and the persistence of high-risk HPV infections.

Keywords: Microbiome; vaginal microbiota; CST; metagenomics; human papillomavirus; *Gardnerella*; *Fannyhessea vaginae*; *Prevotella bivia*.

## Sumário

Capítulo I.....	16
Revisão de Literatura .....	17
1. Classificação do microbioma vaginal .....	18
2. Aspectos da disbiose vaginal.....	21
3. Características associadas à microbiota vaginal .....	23
4. Papilomavírus humano e microbiota vaginal.....	25
5. Referências.....	29
Capítulo II.....	39
Artigo Científico I .....	40
1. Introduction .....	43
2. Material and methods .....	45
3. Results .....	47
4. Discussion .....	48
5. References.....	53
6. Tables and Figures.....	57
Capítulo III.....	64
Artigo Científico II.....	65
1. Introduction .....	69
2. Material and methods .....	70
3. Results .....	73
4. Discussion .....	74
5. References.....	78
6. Tables and Figures.....	83
Capítulo IV .....	89
1. Conclusão Final .....	90

# Capítulo I

---

## **Revisão de Literatura**

---

## 1. Classificação do microbioma vaginal

O microbioma é uma comunidade microbiana em um ambiente com características físico-química, imunológicas, estresse oxidativo específicas, que considera não só a composição taxonômica como também seu potencial funcional (1). Nesse contexto, a saúde reprodutiva das mulheres é afetada pela composição e estabilidade do microbioma vaginal, influenciado por diversas variáveis como hormônios, gestação e fertilidade (2–5). A exemplo disso, estudos mostram que o microbioma vaginal muda significativamente ao longo da gravidez, e fatores hormonais, como o estrogênio, têm impacto na sua composição (3,6). Além disso, há evidências que associam o microbioma ao parto pré-termo, onde composições microbianas específicas foram associadas a um maior risco de parto pré-termo (6–8). Por isso, o equilíbrio do microambiente vaginal é importante para proteger contra aquisição de infecções e enfermidades, tornando-se um aspecto importante da saúde feminina.

Inicialmente, eram utilizadas culturas microbiológicas convencionais para analisar a microbiota vaginal, o que limitava o conhecimento de apenas algumas espécies bacterianas. A partir da evolução dos métodos moleculares, permitiu-se uma melhor determinação do microbioma local usando sequenciamento de nova geração, principalmente do gene codificante do RNA ribossômico 16S. Nesse sentido, Ravel et al.(9), em 2011, caracterizaram pela primeira vez o microbioma vaginal de mulheres em idade reprodutiva num estudo com mulheres americanas em idade reprodutiva de diferentes etnias. Tais autores verificaram que, apesar da grande diversidade microbiana presente nesse ambiente, o microbioma vaginal de todas as mulheres podem ser agrupados em 5 tipos de comunidades bacterianas vaginais (*community-state type*, CST), conforme predominância de determinadas espécies. Do total, quatro são caracterizadas pelo predomínio de *Lactobacillus* spp.: CST I (*Lactobacillus crispatus*), CST II (*L. gasseri*), CST III (*L. iners*) e CST V (*L. jensenii*). Na comunidade bacteriana vaginal remanescente, a CST IV, a predominância de espécies de *Lactobacillus* é substituída por uma maior diversidade de espécies bacterianas, onde se encontra a maioria dos casos de vaginose bacteriana (VB).

No Brasil, o microbioma vaginal foi caracterizado a partir do sequenciamento de porções hipervariáveis do rRNA 16S em um estudo transversal com 609 mulheres das cinco macroregiões do Brasil. As comunidades foram alocadas em CST I (*L. crispatus*), CST II (*L. gasseri*), CST III-A (maior abundância de *L. iners*), CST III-B

(menor abundância de *L. iners*) e CST IV (diversas espécies bacterianas). Nessa população, a comunidade mais frequente encontrada foi a CST III (36,5%), seguida da CST I (30,5%) e CST IV (27,4%) (10).

Em 2020, uma nova classificação de de CSTs foi desenvolvida com base em centroides de referência que permitiram uma maior acurácia na classificação das comunidades bacterianas, usando o VALENCIA (VAginal community state typE Nearest Centroid classifier) (11). O centróide referência usado para isso foi baseado em 13.160 perfis de microbiota vaginal, que incluem representações de todas as CSTs previamente identificadas. Sete CSTs foram identificadas, sendo que quatro delas tinham uma alta abundância relativa de espécies de *Lactobacillus*. Essas sete CSTs foram subdivididos em treze sub-CSTs, com base em sua composição microbiana. As CSTs foram nomeadas de acordo com a classificação anterior, sendo CST I dominada por *L. crispatus*, CST II dominada por *L. gasseri*, CST III dominada por *L. iners*, e CST V dominada por *L. jensenii*. Além disso, foram identificadas três CSTs que não apresentavam uma alta abundância relativa de *Lactobacillus*, denominadas CST IV-A, IV-B e IV-C. A CST IV-A apresentava uma alta abundância relativa de *Candidatus Lachnocurva vaginae* (antes nomeada como BVAB1) (12) e uma abundância moderada de *G. vaginalis*, enquanto a IV-B tinha alta abundância relativa de *G. vaginalis* e baixa abundância relativa de *Ca. L. vaginae*. A CST IV-C, por sua vez, era caracterizado por uma baixa abundância relativa de *Lactobacillus* spp., *G. vaginalis*, a anteriormente conhecida *A. vaginae* e *Ca. L. vaginae*, sendo composta por uma variedade diversa de bactérias facultativas e estritamente anaeróbias. A CST IV-C foi ainda subdividida em cinco sub-CSTs, cada um dominado por diferentes tipos de bactérias: CST IV-C0 (*Prevotella* spp.), CST IV-C01 (*Streptococcus* spp.), CST IV-C02 (*Enterococcus* spp.), CST IV-C03 (*Bifidobacterium* spp.) e CST IV-C04 (*Staphylococcus* spp.). Até então, a distinção dessa nova classificação residia no fato de que a caracterização das CSTs se baseava na diversidade de espécies e na abundância bacteriana dentro de cada população estudada. Por isso, a comparação dos dados de sequenciamento usando os centroides possibilita uma avaliação mais precisa entre populações distintas.

Similar a CSTs, alguns autores recentemente descreveram o termo *vagitypes* na classificação do microbioma onde se consideram as espécies bacterianas com uma abundância relativa superior a 30%, podendo ter mais de duas espécies bacterianas dominantes em uma amostra. As *vagitypes* então são compostas pelas espécies

bacterianas mais dominantes e funcionais dentro do microbioma vaginal (13). Esta classificação tem sido aplicada tanto em mulheres não grávidas quanto grávidas, demonstrando sua relevância em diferentes estados fisiológicos (14,15). O uso de *vagitypes* propõe-se como uma caracterização dos microbiomas vaginais de diversos grupos raciais e étnicos, destacando a importância de considerar variações específicas da população na composição microbiana (6,16,17).

Adicionalmente, os avanços dos estudos com metagenômica, caracterizada pela análise genômica de uma população de microrganismos que permite identificar e avaliar comunidades microbianas em diferentes ecossistemas, permitiram entender não só a composição como também o potencial funcional das espécies bacterianas que integram as CSTs. Nesse contexto, foi desenvolvido o VIRGO (*non-redundant gene catalog for the microbial communities that inhabit the human vagina*) que é um catálogo de genes não redundantes para as comunidades microbianas do ambiente vaginal (18). Ele foi construído usando uma combinação de sequências metagenômicas e genomas isolados urogenitais. O VIRGO pode ser utilizado para caracterizar a composição taxonômica e/ou funcional de conjuntos de dados metagenômicos e metatranscriptômicos vaginais.

A partir disso, recentemente foram descritas 27 mgCSTs (*metagenomic community-state types*) com base no VIRGO onde cada uma é definida por uma subespécie bacteriana diferente (mgSs), sendo que essa subdivisão ocorre de acordo com a constituição genômica e potencial funcional de cada tipo. Nessa nova divisão, mgCSTs 1-6 são dominadas por *L. crispatus*, mgCSTs 7-9 por *L. gasseri*, mgCSTs 10-14 por *L. iners*, mgCSTs 15-16 por *L. jensenii*, mgCSTs 17-19 por *Ca. La. vaginae*, mgCSTs 20-25 por *G. vaginalis*, mgCST 26 por *Bifidobacterium breve* e mgCST 27 por outras espécies bacterianas (19).

O estudo do microbioma vaginal tem evoluído significativamente com o avanço das técnicas moleculares e desde a caracterização inicial das comunidades bacterianas vaginais até a recente classificação com base em centroides de referência, observamos uma diversidade notável na descrição das CSTs presentes. Além disso, o uso da metagenômica permitiu uma compreensão mais profunda não apenas da composição, mas também do potencial funcional das espécies bacterianas que compõem essas comunidades. O catálogo de genes VIRGO facilita a caracterização tanto taxonômica quanto funcional das comunidades microbianas vaginais. Os

avanços se mostram importantes para melhorar a compreensão da microbiota vaginal e seu papel na saúde da mulher.

## 2. Aspectos da disbiose vaginal

A principal disbiose vaginal, a VB é caracterizada à microscopia pela substituição da microbiota predominantemente lactobacilar por uma microbiota cocobacilar Gram mista (21). Sua prevalência é de cerca de 30% na população brasileira (22) e o padrão ouro clínico para seu diagnóstico é o descrito por Nugent (23). Este critério semi-quantifica os morfotipos bacterianos, utilizando a coloração pelo método de Gram, em amostras de esfregaços vaginais de acordo com um escore, sendo de 0-3, microbiota normal, 4-6, microbiota intermediária e 7-10, VB.

Os estudos com base no sequenciamento de nova geração classificam a maioria dos casos de VB nas CSTs IV, onde existe a depleção lactobacilar e maior diversidade de espécies bacterianas (11,24). Embora essa condição esteja associada a uma grande diversidade bacteriana no ambiente vaginal, a espécie *Gardnerella vaginalis* está presente em quase a totalidade dos casos (25), sendo o primeiro microrganismo associado à essa alteração (26).

O gênero *Gardnerella* permaneceu, muito tempo, único e composto por somente uma espécie. Em 2011, Santiago et al. (27), a partir de métodos de análise de restrição de DNA ribossomal (ARDRA), detectou a presença de três genótipos de *G. vaginalis* diferentes. Posteriormente, Ahmed et al.(28) realizou uma nova classificação, pelo pirosequenciamento, no qual foram identificados 4 subgrupos (1 a 4). Em 2016, mais um achado, usando sequenciamento de Sanger do gene CPN60, confirmou a existência dos 4 subgrupos, classificados como A, B, C e D, equivalente aos grupos 4, 2, 1 e 3, respectivamente(28,29). Adicionalmente, um outro estudo partir da hibridização de DNA-DNA (dDDH) e da identidade média de nucleotídeos (ANI), identificou, a partir de 10 linhagens de *G. vaginalis*, 3 novas espécies genômicas de *Gardnerella* spp., que com base na classificação de Ahmed et al.(28), o grupo 1 possui duas espécies, descrita como *G. vaginalis* (30) e o grupo 2 contém 3 espécies, descritas como *G. piovii*. Já o grupo 4 contém 2 espécies descritas como *G. leopoldii* e *G. swidsinskii*. Atualmente, existem outras espécies genômicas de *Gardnerella*

descritas que compõem 6 mgCSTs classificadas de acordo com seus diferentes genes (19).

A presença de *Gardnerella* spp. é encontrada em quase a totalidade dos casos de VB e os fatores virulência desta podem contribuir pra isso. Um estudo recente mostrou que a presença de atividade de sialidase desse gênero favorece o crescimento de outras espécies bacterianas associadas à VB, como *Leptotrichia amnionii*, *Megasphaera* spp. e *Mobiluncus curtisii* (31). As sialidases são enzimas produzidas por algumas linhagens de *Gardnerella* que hidrolisam o ácido siálico das células epiteliais do hospedeiro, expondo sítios de ligação que facilitam a adesão da *Gardnerella* spp. ao epitélio (32,33). A presença de biofilmes associados à VB propicia uma proteção dos microrganismos que os compõe da ação do peróxido de hidrogênio, ácido láctico e bacteriocinas secretadas em condições normais pelos *Lactobacillus* spp. (34). Além disso, as moléculas de ácido siálico podem ser utilizadas no metabolismo energético da bactéria (35), ou ainda podem recobrir a superfície bacteriana, dificultando a fagocitose (33,36). Estudos já demonstraram que as sialidases são capazes de diminuir a viscosidade do conteúdo cérvico-vaginal, além de exercerem ação proteolítica nas imunoglobulinas A presentes na secreção cervical (37,38).

Trabalhos demonstraram que, embora a capacidade de produção de sialidases pela *G. vaginalis* esteja presente em apenas algumas linhagens, esta espécie contribui para a quase totalidade das sialidases detectadas no ambiente cérvico-vaginal (38). A presença de *G. vaginalis* sialidases-produtoras está associada tanto à VB como à produção de biofilmes vaginais (30,39). Adicionalmente, outros fatores de virulência são produzidos pelo gênero *Gardnerella*, a exemplo de espécies genômicas como *Gardnerella* spp. 11 e *Gardnerella* spp. 13 que produzem a vaginolisina, responsável pela lise das células epiteliais; hemolisina, responsável pela lise dos eritrócitos; e o precursor da enzima muralítica (RpF2) (19).

O modelo proposto da patogênese da VB descrito por Muzny et al. (40,41) discorre que inicialmente linhagens a presença de linhagens virulentas de *G. vaginalis* contribui para depleção lactobacilar e inicia a formação de biofilme pela produção de sialidase. Essas bactérias provocam a proteólise aumentando a quantidade de aminoácidos que promovem o crescimento de *Prevotella bivia*. Concomitantemente, a *P. bivia* produz amônia que induz o crescimento de *G. vaginalis*, o que estabelece uma relação de sinergia entre as duas espécies (42). O biofilme então cresce, e a sialidase produzida tanto pela *G. vaginalis* quanto pela *P. bivia* promove a quebra na camada protetora do

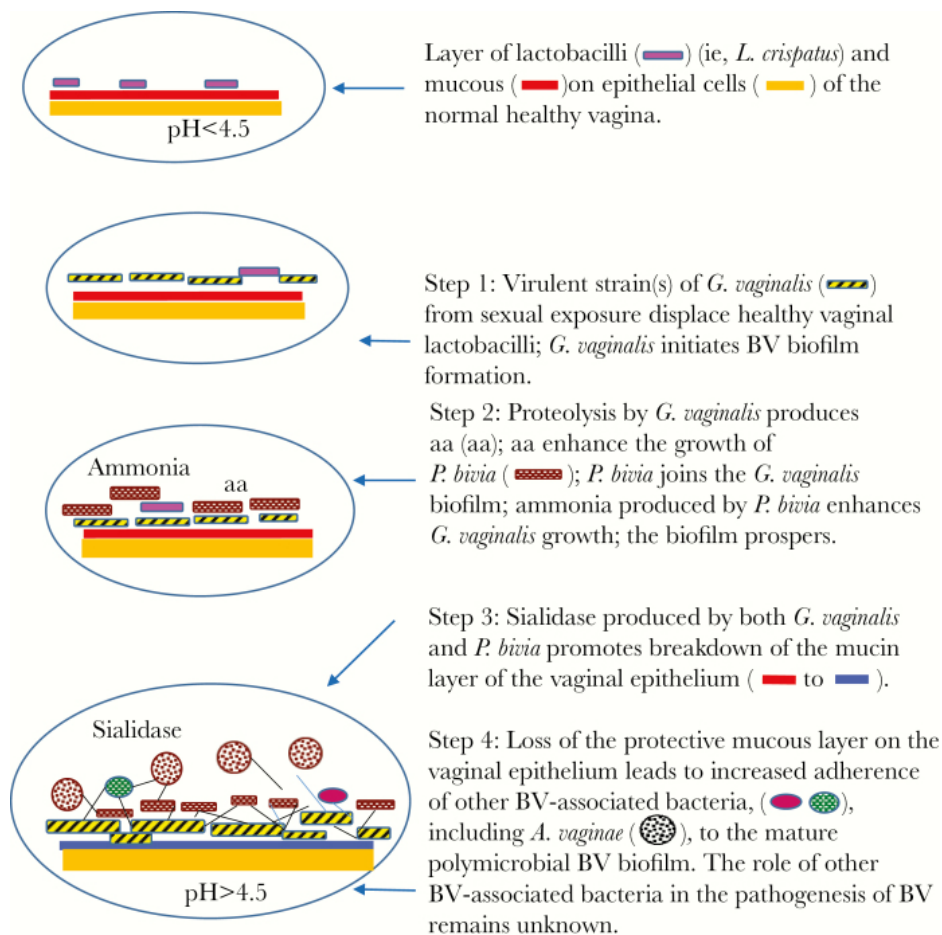
epitélio vaginal através da quebra do ácido siálico provocado pela imunoglobulina A. Isto, expõe sítios de ligação que permitem a ligação de outras espécies presentes na VB. Uma delas comumente encontrada é a *Fannyhessea vaginae* (antes nomeada *Atopobium vaginae*) que cresce no biofilme já maduro (**Fig. 1**).

A relação da *P. bivia* e da *F. vaginae* na composição do core bacteriano presente na VB pode ser explicada por um trabalho do mesmo grupo que descreveu o modelo onde foi mostrada a capacidade de *F. vaginae* (*F. vaginae*) e *P. bivia* (*P. bivia*) de se integrarem ao biofilme já existente de *G. vaginalis* (*G. vaginalis*), mostrado em biofilmes duplos (*G. vaginalis*+*F. vaginae* e *G. vaginalis*+*P. bivia*) e triplos (*G. vaginalis*+*F. vaginae*+*P. bivia*). No entanto, a habilidade de integração ao biofilme por parte de *F. vaginae* e *P. bivia* não necessariamente influencia a expressão dos fatores de virulência em *G. vaginalis*. Enquanto a sialidase, vaginolisina e os transcritos que codificam genes de resistência antimicrobiana específicos não apresentaram diferenças significativas na expressão entre o mono-biofilme de *Gardnerella* e os biofilmes duplos ou triplos, os genes de glicosiltransferases tipo II (envolvidos na manutenção do biofilme) e a Rib-proteína (que desencadeia imunidade protetora por meio da variação de tamanho entre as cepas de *G. vaginalis*) foram encontrados superexpressos nos biofilmes triplos em comparação com o mono-biofilme de *G. vaginalis* (43). Esses resultados enfatizam a complexidade da VB e sua relação com a microbiota vaginal e seus papéis na patogênese dessa condição.

### **3. Características associadas à microbiota vaginal**

Considerando a diversidade da microbiota vaginal em relação a sua composição, existe uma relação entre sua variância e diversos fatores clínicos, comportamentais e sociodemográficos. A exemplo disso, o estilo de vida, como dieta, práticas de higiene e atividade sexual podem alterar a composição do microbioma (2,44). Ademais, o uso de contraceptivos de progesterona e a prática de exercícios intensos, por exemplo, foram associadas com a diminuição de espécies lactobacilares (2,45).

Etnicamente, as mulheres asiáticas e brancas têm mais probabilidade de possuir CSTs dominadas por *Lactobacillus*, como CST I, II, III e V, em comparação a mulheres negras ou hispânicas (45). Mulheres asiáticas também apresentaram, embora uma alta presença de CST III dominada *L. iners*, uma baixa presença de VB em relação a



**Figura 1.** Modelo da patogênese da vaginose bacteriana. Linhagens virulentas de *G. vaginalis* inicia a formação do biofilme, seguida da *P. bivia* e seus fatores de virulência facilitam a adesão no biofilme maduro de outros microrganismos como *F. vaginae*. Figura retirada de Muzny et al. (40)

outras etnias (46). Isso pode se dar ao fato de que variáveis geográficas e culturais também podem impactar a composição microbiana da microbiota vaginal (16).

A produção de ácido láctico pelas espécies de *Lactobacillus* é essencial para manter um pH vaginal baixo, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas (47). Alterações no microbioma, especialmente a redução de *Lactobacillus*, podem elevar o pH vaginal, tornando-o mais suscetível à invasão de patógenos (48). A fertilidade e os níveis hormonais e também podem influenciar a composição do microbioma vaginal, afetando o pH (49). Por isso, a disbiose provocada por essas alterações, como a VB, podem estar associadas a essa alteração de pH (50,51). Durante a menopausa, a redução nos níveis de estrogênio eleva o pH vaginal, o que provoca a diminuição do domínio de *Lactobacillus* spp. (52).

O comportamento sexual, como o aumento no número de parceiros sexuais pode também mudar a microbiota vaginal e alterar a alfa-diversidade microbiana (53). Outro

achado apontou que a relação sexual facilita a troca de componentes da microbiota entre parceiros, o que pode alterar as microbiotas urinária e vaginal, onde se observou um aumento de *G. vaginalis* após a relação sexual (54,55). Além disso, essa interação pode levar a uma maior diversidade bacteriana no sêmen e a uma menor abundância relativa de *L. crispatus* em amostras vaginais, resultando em maior concordância entre os microrganismos encontrados entre parceiros (56).

A microbiota vaginal também influencia a susceptibilidade a várias infecções sexualmente transmissíveis (ISTs). Pesquisas mostraram que alterações na composição da microbiota vaginal podem aumentar a vulnerabilidade a ISTs causadas por *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e o papilomavírus humano (HPV) (57–62). Particularmente, uma microbiota vaginal diversa, com baixa presença de espécies de *Lactobacillus*, como observado na vaginose VB, está ligada a uma maior prevalência de ISTs (59). Além disso, o metaboloma vaginal está associado a prevalência de ISTs, com mulheres com diagnóstico por ISTs exibindo maior prevalência de VB, sugerindo uma possível interação entre os metabólitos vaginais e os desfechos de aquisição de ISTs (63).

#### **4. Papilomavírus Humano e microbiota vaginal**

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus da família *Papillomaviridae*, caracterizado por ser não envelopado, constituído por um capsídeo de simetria icosaédrica, que engloba uma molécula de DNA circular de dupla fita com aproximadamente 8000 bp (64). 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 do ciclo viral. A próxima região é a precoce que codifica 6 proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) que possuem ação enzimática ou reguladora no ciclo viral. Dentre essas, merecem destaque as proteínas E6 e E7, que inativam, respectivamente, os supressores tumorais p53 e pRB da célula infectada, estando envolvidas diretamente na imortalização dessas células e, portanto, no desenvolvimento de neoplasias (65–67). Finalmente, os genes da região tardia (*late*) que codificam as duas proteínas que compõem o capsídeo viral, a L1 e L2, altamente imunogênicas, utilizadas na produção de vacinas profiláticas (67). O HPV é um vírus epiteliotrópico, ou seja, sua infecção ocorre pela camada basal do epitélio a partir de microlesões, e após migrar para as

camadas intermediárias do epitélio, se replica, podendo levar ao aparecimento de lesões proliferativas (68).

Atualmente, são descritos mais de 100 genótipos de HPV que infectam o homem, dentre os quais 40 tem afinidade para o epitélio da região anogenital e alguns destes tipos estão envolvidos no aparecimento do fenótipo celular maligno (64). Dessa forma, a classificação dos HPV genitais é feita de acordo com seu potencial oncogênico, divididos em genótipos de baixo (lrHPV) ou intermediário risco e alto risco (hrHPV) oncogênico, sendo este responsável por 5% de todos os cânceres diagnosticados anualmente no mundo (69–72). Em relação aos lrHPV, destacam-se os HPV6 e HPV11, associados ao desenvolvimento de verrugas genitais. Já os HPV16 e HPV18 são associados ao maior período de persistência da infecção levando ao desenvolvimento das lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos do colo do útero, sendo responsáveis por 70% dos casos de carcinomas epidermóides e mais de 80% dos adenocarcinomas do colo do útero (73–76).

As infecções por HPV genitais são, em geral, de caráter transitório, visto que a maioria das infecções é eliminada pelo sistema imunológico do hospedeiro (*clearance* viral) num período entre 1 a 2 anos (77), entretanto, algumas infecções permanecem, pela presença da infecção por hrHPV (71). A literatura é consistente ao demonstrar que o HPV16 apresenta os períodos de infecção mais longos, mesmo quando comparado aos demais HPV de alto risco oncogênico (78,79). Além disso, também foi apontado que a presença de múltiplos genótipos de HPV atrasa o tempo de *clearance* (80).

Contudo, além do genótipo viral, o tempo de *clearance* do HPV pode ser influenciado por outros fatores como: dietas pobres em nutrientes, uso de absorventes internos, contraceptivos de progesterona, presença de outro vírus como o da imunodeficiência humana (HIV) (81,82) e presença de coinfeções, relacionadas ao ambiente vaginal, como as endocervicites causadas pela *Chlamydia trachomatis* e ectocervicite *Trichomonas vaginalis* (83–85).

Além das infecções sexualmente transmissíveis, diversos estudos com base no sequenciamento de nova geração foram realizados para determinar o papel da microbiota vaginal no contexto das infecções pelo HPV (86).

A microbiota lactobacilar é importante para a manutenção do ambiente vaginal saudável, sendo um gênero muito estudado na sua relação com HPV. Menores abundâncias de *Lactobacillus* e maior diversidade de outras espécies como *Prevotella*

e *Megasphaera* foram encontradas em mulher com câncer cervical (87). Mais especificamente, o aumento de *L. crispatus* foi associado a ausência de hrHPV enquanto a diminuição foi associada a presença deste (88). Por outro, o *L. iners* foi negativamente associado ao HPV clearance (89,90) e também ao HPV positivo (91).

Alguns estudos mostram espécies relacionadas a VB com lesões cervicais. Zhai et al. (92) mostraram uma maior abundância do filo *Actinobacteria*, e dos gêneros *Gardnerella*, e *Prevotella* em mulheres com lesões ou hrHPV positivo. Outros autores avaliaram um aumento dos gêneros *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Prevotella* em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e HPV (93) e em NIC2+ aumento de *L. crispatus*, *S. agalactiae* e *B. fragilis* (94).

Outros achados avaliaram a diversidade de espécies bacterianas em relação ao HPV. Hu et al. (95) mostrou que o microbioma com a presença de HPV exibe maior diversidade de espécies em relação as pacientes com HPV negativo. Adicionalmente, a transição de CST I para CST IV foi encontrada em mulheres com hrHPV persistentes (91) e maior diversidade de espécies no microbioma cervical em relação ao vaginal em mulheres HPV16 e 18 positivas também foi encontrada (90). Em relação as lesões cervicais, já foi apontado que mulheres com lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma escamoso *in situ* (SCC) apresentaram maior diversidade em comparação a mulheres sem lesão (96).

Considerando as espécies bacterianas envolvidas no modelo da patogênese da VB proposto por Muzny et al. (*Gardnerella* spp., *F. vaginae* e *P. bivia*) (40,41), *Gardnerella* spp. foi associado previamente com a infecção pelo HPV. Maior abundância de *Gardnerella* foi encontrada em mulheres HPV positivas (89,97) e hrHPV persistentes (98), sendo também um potencial biomarcador para a progressão de hrHPV (99). Outros achados recentes do nosso grupo apontaram que a maior carga de *Gardnerella* spp. está associada a persistência do HPV16 e HPV18 após 11 meses (100), assim como o gene codificante da sialidase (NanH3), importante fator de virulência, também se encontrou aumentado em mulheres com HPV16 persistentes (101). Adicionalmente, um estudo baiano realizado por reação em cadeia polimerase (PCR) mostrou associação da presença de *Gardnerella* spp. no ambiente vaginal com a presença de lesões cervicais, enquanto outro, realizado no Paraná, mostrou que somente a bactéria *G. vaginalis* não estaria associada as lesões precursoras do câncer do colo de útero (102,103). O aumento na abundância de *F. vaginae* foi encontrado tanto em mulheres HPV positivas quanto em mulheres com hrHPV em

relação àquelas com hrHPV ou sem HPV (91,104). *Atopobium* e *Gardnerella* foram encontradas em maior quantidade em mulheres com HPV16 e 18 com câncer cervical (105) e em menor proporção em mulheres hrHPV negativas (88). O gênero *Prevotella* foi associada também a positividade do HPV (91) e seu aumento junto com *G. vaginalis* e *Atobobium* foram presentes em pacientes com lesões cervicais (106). Acerca disso, outro achado revelou que ausência de *L. crispatus* e presença de *L. iners*, *Atopobium* spp., *Prevotella* e *Gardnerella* podem indicar desenvolvimento de lesão cervical (96).

A formação de biofilme se mostra importante para o estabelecimento da VB (43,107), mas os estudos relacionando isso com o HPV são escassos. Um estudo recente mostrou que houve uma maior taxa de formação de biofilme em mulheres com HPV em comparação a ausência deste. Ademais, foi observado uma relação estatisticamente significativa entre a presença de um único genótipo de HPV único e os hrHPVs em relação a formação de biofilme. Além disso, verificou-se que a formação de biofilme ocorreu em 80% das mulheres com esfregaço com alguma alteração indicando a presença de células epiteliais atípicas (108).

A importante relação entre a infecção pelo HPV e a composição do microbioma vaginal, bem como as graves complicações associadas às duas condições, ressaltam a necessidade de se determinar qual parcela da população apresenta, em risco, para infecções persistentes de HPV. Dessa forma, os estudos de espécies bacterianas, como *Gardnerella* spp., *P. bivia* e *A. vaginae*, que estão envolvidas na etiologia e persistência da VB, permite a melhor compreensão da relação entre a microbiota vaginal e o desfecho da infecção pelo HPV.

## 5. Referências

1. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. Vol. 8, Microbiome. BioMed Central Ltd; 2020.
2. Song SD, Acharya KD, Zhu JE, Deveney CM, Walther-Antonio MRS, Tetel MJ, et al. Daily Vaginal Microbiota Fluctuations Associated with Natural Hormonal Cycle, Contraceptives, Diet, and Exercise. *mSphere*. 2020 Aug 26;5(4).
3. MacIntyre DA, Chandiramani M, Lee YS, Kindinger L, Smith A, Angelopoulos N, et al. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci Rep*. 2015 Mar 11;5.
4. Alvisi S, Ceccarani C, Foschi C, Baldassarre M, Lami A, Severgnini M, et al. Effect of ospemifene on vaginal microbiome in postmenopausal women with vulvovaginal atrophy. *Menopause*. 2023 Apr 1;30(4):361–9.
5. Zhao C, Wei Z, Yang J, Zhang J, Yu C, Yang A, et al. Characterization of the Vaginal Microbiome in Women with Infertility and Its Potential Correlation with Hormone Stimulation during In Vitro Fertilization Surgery . *mSystems*. 2020 Aug 25;5(4).
6. Odogwu NM, Chen J, Onebunne CA, Jeraldo P, Yang L, Johnson S, et al. Predominance of *Atopobium vaginae* at Midtrimester: a Potential Indicator of Preterm Birth Risk in a Nigerian Cohort. *mSphere*. 2021 Feb 24;6(1).
7. Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, Fung E, Rand L, Johnson B, et al. Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reproductive Sciences*. 2014 Jan;21(1):32–40.
8. Hočevár K, Maver A, Vidmar Šimic M, Hodžić A, Haslberger A, Premru Seršen T, et al. Vaginal Microbiome Signature Is Associated With Spontaneous Preterm Delivery. *Front Med (Lausanne)*. 2019 Sep 10;6.
9. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(SUPPL. 1):4680–7.
10. Marconi C, El-Zein M, Ravel J, Ma B, Lima MD, Carvalho NS, et al. Characterization of the vaginal microbiome in women of reproductive age from 5 Regions in Brazil. *Sex Transm Dis*. 2020 Aug 1;47(8):562–9.
11. France MT, Ma B, Gajer P, Brown S, Humphrys MS, Holm JB, et al. VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. *Microbiome*. 2020 Dec 1;8(1).
12. Holm JB, France MT, Ma B, McComb E, Robinson CK, Mehta A, et al. Comparative Metagenome-Assembled Genome Analysis of “*Candidatus Lachnocurva vaginae*”, Formerly

Known as Bacterial Vaginosis-Associated Bacterium-1 (BVAB1). *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Mar 31;10.

13. Serrano MG, Parikh HI, Brooks JP, Edwards DJ, Arodz TJ, Edupuganti L, et al. Racioethnic diversity in the dynamics of the vaginal microbiome during pregnancy. *Nat Med.* 2019 Jun 1;25(6):1001–11.
14. Mendz GL. The Vaginal Microbiome during Pregnancy in Health and Disease. *Appl Microbiol.* 2023 Nov 30;3(4):1302–38.
15. Dunlop AL, Satten GA, Hu YJ, Knight AK, Hill CC, Wright ML, et al. Vaginal Microbiome Composition in Early Pregnancy and Risk of Spontaneous Preterm and Early Term Birth Among African American Women. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Apr 29;11.
16. Roachford OSE, Alleyne AT, Nelson KE. Insights into the vaginal microbiome in a diverse group of women of African, Asian and European ancestries. *PeerJ.* 2022 Nov 29;10.
17. Fettweis JM, Serrano MG, Brooks JP, Edwards DJ, Girerd PH, Parikh HI, et al. The vaginal microbiome and preterm birth. *Nat Med.* 2019 Jun 1;25(6):1012–21.
18. Ma B, France MT, Crabtree J, Holm JB, Humphrys MS, Brotman RM, et al. A comprehensive non-redundant gene catalog reveals extensive within-community intraspecies diversity in the human vagina. *Nat Commun.* 2020 Dec 1;11(1).
19. Holm JB, France MT, Gajer P, Ma B, Brotman RM, Shardell M, et al. Integrating compositional and functional content to describe vaginal microbiomes in health and disease. *Microbiome.* 2023 Dec 1;11(1).
20. Zhu B, Spaine KM, Edupuganti L, Matveyev A, Serrano MG. Characteristics of vaginal microbes and classification of the vaginal microbiome 1. Available from: <https://doi.org/10.1101/2023.08.16.553525>
21. Muzny CA, Taylor CM, Swords WE, Tamhane A, Chattopadhyay D, Cerca N, et al. An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis.* 2019;220(9):1399–405.
22. Marconi C, Duarte MTC, Silva DC, Silva MG. Prevalence of and risk factors for bacterial vaginosis among women of reproductive age attending cervical screening in southeastern Brazil. *International Journal of Gynecology and Obstetrics [Internet].* 2015;131(2):137–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.05.016>
23. 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(2):297–301.
24. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(SUPPL. 1):4680–7.

25. Marconi C, Donders GG, Parada CMGL, Giraldo PC, Da Silva MG. Do *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* sp. and *Leptotrichia* sp. change the local innate immune response and sialidase activity in bacterial vaginosis? *Sex Transm Infect.* 2013;89(2):167–73.
26. Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified “nonspecific” vaginitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1955;69(5):962–76.
27. Lopes Dos Santos Santiago G, Deschaght P, El Aila N, Kiama TN, Verstraelen H, Jefferson KK, et al. *Gardnerella vaginalis* comprises three distinct genotypes of which only two produce sialidase. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2011;204(5):450.e1-450.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2010.12.061>
28. Ahmed A, Earl J, Retchless A, Hillier SL, Rabe LK, Cherpes TL, et al. Comparative genomic analyses of 17 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* provide evidence of multiple genetically isolated clades consistent with subspeciation into genovars. *J Bacteriol.* 2012;194(15):3922–37.
29. Schellenberg JJ, Jayaprakash TP, Gamage NW, Patterson MH, Vaneechoutte M, Hill JE. *Gardnerella vaginalis* subgroups defined by cpn60 sequencing and sialidase activity in isolates from Canada, Belgium and Kenya. *PLoS One.* 2016;11(1):1–12.
30. Hardy L, Jespers V, Van Bulck M Den, Buyze J, Mwambarangwe L, Musengamana V, et al. The presence of the putative *Gardnerella vaginalis* sialidase A gene in vaginal specimens is associated with bacterial vaginosis biofilm. *PLoS One.* 2017;12(2):1–11.
31. Ferreira CST, Marconi C, Parada CMGL, Ravel J, Silva MG da. Sialidase Activity in the Cervicovaginal Fluid Is Associated With Changes in Bacterial Components of Lactobacillus-Deprived Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jan 13;11.
32. Varki A. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. *Glycoconj J.* 2009;26(3):231–45.
33. Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1253(1):16–36.
34. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstetrics and Gynecology.* 2005;106(5):1013–23.
35. Severi E, Hood DW, Thomas GH. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology (N Y).* 2007;153(9):2817–22.
36. Harvey HA, Swords WE, Apicella MA. The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *J Autoimmun.* 2001;16(3):257–62.

37. Lewis WG, Robinson LS, Gilbert NM, Perry JC, Lewis AL. Degradation, foraging, and depletion of mucus sialoglycans by the vagina-adapted actinobacterium *Gardnerella vaginalis*. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(17):12067–79.
38. Lewis WG, Robinson LS, Perry J, Bick JL, Peipert JF, Allsworth JE, et al. Hydrolysis of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin a (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(3):2079–89.
39. Janulaitiene M, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauskiene A, Marcinkute A, et al. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups in women with and without bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):1–9.
40. Muzny CA, Taylor CM, Swords WE, Tamhane A, Chattopadhyay D, Cerca N, et al. An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis*. 2019;220(9):1399–405.
41. Muzny CA, Łaniewski P, Schwebke JR, Herbst-Kralovetz MM. Host-vaginal microbiota interactions in the pathogenesis of bacterial vaginosis. Vol. 33, *Current Opinion in Infectious Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 59–65.
42. Pybus V, Onderdonk AB. Evidence for a Commensal, Symbiotic Relationship between *Gardnerella vaginalis* and *Prevotella bivia* Involving Ammonia: Potential Significance for Bacterial Vaginosis [Internet]. 1997. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/175/2/406/816720>
43. Castro J, Rosca AS, Muzny CA, Cerca N. *Atopobium vaginae* and *Prevotella bivia* are able to incorporate and influence gene expression in a pre-formed *Gardnerella vaginalis* biofilm. *Pathogens*. 2021 Feb 1;10(2):1–16.
44. Kwon MS, Lee HK. Host and Microbiome Interplay Shapes the Vaginal Microenvironment. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
45. Holdcroft AM, Ireland DJ, Payne MS. The Vaginal Microbiome in Health and Disease—What Role Do Common Intimate Hygiene Practices Play? Vol. 11, *Microorganisms*. MDPI; 2023.
46. Holm JB, France MT, Gajer P, Ma B, Brotman RM, Shardell M, et al. Integrating compositional and functional content to describe vaginal microbiomes in health and disease. *Microbiome*. 2023 Dec 1;11(1).
47. Allahqoli L, Dehdari T, Rahmani A, Fallahi A, Gharacheh M, Hajinasab N. Delayed cervical cancer diagnosis: a systematic review.
48. Kwon KM, Kim EH, Sim KH, Lee YJ, Kang EJ, Han KH, et al. Phenylacetic acid, an anti-vaginitis metabolite produced by the vaginal symbiotic bacterium *Chryseobacterium gleum*. *Sci Rep*. 2024 Dec 1;14(1).

49. Xu X, Zhang Y, Yu L, Shi X, Min M, Xiong L, et al. A cross-sectional analysis about bacterial vaginosis, high-risk human papillomavirus infection, and cervical intraepithelial neoplasia in Chinese women. *Sci Rep.* 2022 Dec 1;12(1).
50. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KCS, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *American Journal of Medicine.* 1983;74(1):14–22.
51. Pereira MP, Jones S, Costin JM. Association of Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) With Vaginal Microbiome Dysbiosis: A Scoping Review. *Cureus.* 2024 Jun 18;
52. Park MG, Cho S, Oh MM. Menopausal Changes in the Microbiome—A Review Focused on the Genitourinary Microbiome. Vol. 13, *Diagnostics.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
53. Miller EA, Livermore JA, Alberts SC, Tung J, Archie EA. Ovarian cycling and reproductive state shape the vaginal microbiota in wild baboons. *Microbiome.* 2017;5(1).
54. Ma Z. Microbiome Transmission During Sexual Intercourse Appears Stochastic and Supports the Red Queen Hypothesis. *Front Microbiol.* 2022 Mar 8;12.
55. Magill RG, MacDonald SM. Male infertility and the human microbiome. Vol. 5, *Frontiers in Reproductive Health.* Frontiers Media SA; 2023.
56. Ahannach S. Microbial and seminal traces of sexual intercourse and forensic implications. Available from: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4302243/v1>
57. Shipitsyna E, Khusnutdinova T, Budilovskaya O, Krysanova A, Shalepo K, Savicheva A, et al. Bacterial vaginosis-associated vaginal microbiota is an age-independent risk factor for Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium and Trichomonas vaginalis infections in low-risk women, St. Petersburg, Russia. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03831-w>
58. Rose WA, McGowin CL, Spagnuolo RA, Eaves-Pyles TD, Popov VL, Pyles RB. Commensal bacteria modulate innate immune responses of vaginal epithelial cell multilayer cultures. *PLoS One.* 2012 Mar 7;7(3).
59. Wessels JM, Lajoie J, Vitali D, Omollo K, Kimani J, Oyugi J, et al. Association of high-risk sexual behaviour with diversity of the vaginal microbiota and abundance of Lactobacillus. *PLoS One.* 2017 Nov 1;12(11).
60. Bik EM, Bird SW, Bustamante JP, Leon LE, Nieto PA, Addae K, et al. A novel sequencing-based vaginal health assay combining self-sampling, HPV detection and genotyping, STI detection, and vaginal microbiome analysis. *PLoS One.* 2019 May 1;14(5).

61. Balle C, Lennard K, Dabee S, Barnabas SL, Jaumdally SZ, Gasper MA, et al. Endocervical and vaginal microbiota in South African adolescents with asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infection. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
62. Shannon B, Yi TJ, Perusini S, Gajer P, Ma B, Humphrys MS, et al. Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. *Mucosal Immunol*. 2017;10(5):1310–9.
63. Borgogna JLC, Shardell MD, Yeoman CJ, Ghanem KG, Kadriu H, Ulanov A V., et al. The association of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* infection with the vaginal metabolome. *Sci Rep*. 2020 Feb 25;10(1):3420.
64. Hausen H zur. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1996;1288(2):F55–78.
65. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002;89(2):213–28.
66. 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(6):1129–36.
67. 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(13):4099–105.
68. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:2–13.
69. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006;118(12):3030–44.
70. Dalton-Griffin L, Kellam P. Infectious causes of cancer and their detection. *J Biol*. 2009;8(7):1–5.
71. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):244–65.
72. Almonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, et al. Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2011;21(9):1654–63.
73. Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):3–13.

74. 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(3):621–32.
75. Muñoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V., et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(6):518–27.
76. 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. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2017;138(1):62–8.
77. 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(1):1–18.
78. Richardson H, Abrahamowicz M, Tellier PP, Kelsall G, Du Berger R, Ferenczy A, et al. Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university students. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2005;14(5):1149–56.
79. van der Weele P, van Logchem E, Wolffs P, van den Broek I, Feltkamp M, de Melker H, et al. Correlation between viral load, multiplicity of infection, and persistence of HPV16 and HPV18 infection in a Dutch cohort of young women. *Journal of Clinical Virology [Internet]*. 2016;83:6–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.020>
80. Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, et al. Long-term persistence of prevalently detected human papillomavirus infections in the absence of detectable cervical precancer and cancer. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;203(6):814–22.
81. 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(5):486–94.
82. Adler D, Wallace M, Bennie T, Abar B, Sadeghi R, Meiring T, et al. High Risk Human Papillomavirus Persistence Among HIV-infected Young Women in South Africa. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015;33:219–21.
83. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer in Brazil and the Philippines . *J Infect Dis*. 2002;185(3):324–31.
84. Menon S, Broeck D Vanden, Rossi R, Ogbe E, Harmon S, Mabeya H. Associations Between Vaginal Infections and Potential High-risk and High-risk Human Papillomavirus Genotypes in Female Sex Workers in Western Kenya. *Clin Ther [Internet]*. 2016;38(12):2567–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.10.005>

85. Ji Y, Ma XX, Li Z, Peppelenbosch MP, Ma Z, Pan Q. The Burden of Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis Coinfection in Women: A Large Cohort Study in Inner Mongolia, China. *Journal of Infectious Diseases*. 2019;219(2):206–14.
86. Głowienka-Stodolak M, Bagińska-Drabiuk K, Szubert S, Hennig EE, Horala A, Dąbrowska M, et al. Human Papillomavirus Infections and the Role Played by Cervical and Cervico-Vaginal Microbiota—Evidence from Next-Generation Sequencing Studies. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2024 Jan 17;16(2):399. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/16/2/399>
87. Wu S, Ding X, Kong Y, Acharya S, Wu H, Huang C, et al. The feature of cervical microbiota associated with the progression of cervical cancer among reproductive females. *Gynecol Oncol*. 2021 Nov 1;163(2):348–57.
88. Fang B, Li Q, Wan Z, OuYang Z, Zhang Q. Exploring the Association Between Cervical Microbiota and HR-HPV Infection Based on 16S rRNA Gene and Metagenomic Sequencing. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jun 21;12.
89. Smith BC, McAndrew T, Chen Z, Harari A, Barris DM, Viswanathan S, et al. The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization. *PLoS One*. 2012 Jul 9;7(7).
90. Shi W, Zhu H, Yuan L, Chen X, Huang X, Wang K, et al. Vaginal microbiota and HPV clearance: A longitudinal study. *Front Oncol*. 2022 Oct 24;12.
91. Andralojc KM, Molina MA, Qiu M, Spruijtenburg B, Rasing M, Pater B, et al. Novel high-resolution targeted sequencing of the cervicovaginal microbiome. *BMC Biol*. 2021 Dec 1;19(1).
92. Zhai Q, Zhang W, Zhang Z, Fu Y, Li Y, Wang X, et al. Characteristics of the Cervicovaginal Microenvironment in Childbearing-Age Women with Different Degrees of Cervical Lesions and HR-HPV Positivity. *Pol J Microbiol*. 2021 Dec 1;70(4):489–500.
93. Liu CJ, Xiao WY, Fang JF, Dong YH, Ye KF, He MP, et al. Genital Microbiota of Women From Six Ethnic Groups With and Without Human Papillomavirus Infection in Shangri-La, China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 8;12.
94. Zhang C, Liu Y, Gao W, Pan Y, Gao Y, Shen J, et al. The direct and indirect association of cervical microbiota with the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Med*. 2018 May 1;7(5):2172–9.
95. Hu J, Wu Y, Quan L, Yang W, Lang J, Tian G, et al. Research of cervical microbiota alterations with human papillomavirus infection status and women age in Sanmenxia area of China. *Front Microbiol*. 2022 Oct 6;13.
96. Stoian IL, Botezatu A, Fudulu A, Ilea CG, Socolov DG. Exploring Microbiota Diversity in Cervical Lesion Progression and HPV Infection through 16S rRNA Gene Metagenomic Sequencing. *J Clin Med*. 2023 Aug 1;12(15).

97. Onywera H, Williamson AL, Mbulawa ZZA, Coetzee D, Meiring TL. The cervical microbiota in reproductive-age South African women with and without human papillomavirus infection. *Papillomavirus Research*. 2019 Jun 1;7:154–63.
98. 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* [Internet]. 2017;7(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>
99. Usyk M, Zolnik CP, Castle PE, Porras C, Herrero R, Gradissimo A, et al. Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study. *PLoS Pathog* [Internet]. 2020;16(3):1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008376>
100. Belletti R, Marcolino LD, Novak J, Ferreira CST, do Nascimento Bolpetti A, da Silva Pinto GV, et al. Cervicovaginal loads of *Gardnerella* spp. are increased in immunocompetent women with persistent high-risk human papillomavirus infection. *J Med Microbiol*. 2022;71(5):1–8.
101. Novak J, Belletti R, da Silva Pinto GV, do Nascimento Bolpetti A, da Silva MG, Marconi C. Cervicovaginal *Gardnerella* sialidase-encoding gene in persistent human papillomavirus infection. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
102. Amorim AT, Marques LM, Campos GB, Lobão TN, de Souza Lino V, Cintra RC, et al. Co-infection of sexually transmitted pathogens and Human Papillomavirus in cervical samples of women of Brazil. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):1–12.
103. Suehiro TT, Malaguti N, Damke E, Uchimura NS, Gimenes F, Souza RP, et al. Association of human papillomavirus and bacterial vaginosis with increased risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesions. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2019;29(2):242–9.
104. Arokiyaraj S, Seo SS, Kwon M, Lee JK, Kim MK. Association of cervical microbial community with persistence, clearance and negativity of Human Papillomavirus in Korean women: a longitudinal study. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33750-y>
105. Zhang Z, Li T, Zhang D, Zong X, Bai H, Bi H, et al. Distinction between vaginal and cervical microbiota in high-risk human papilloma virus-infected women in China. *BMC Microbiol*. 2021 Dec 1;21(1).
106. Li C, Zhang Z, Yang Y, Liao H. Changes in the cervicovaginal microbiota composition of HPV16-infected patients after clinical treatment. *Cancer Med*. 2022 Dec 1;11(24):5037–49.
107. Rosca AS, Castro J, Sousa LGV, França A, Vanechoutte M, Cerca N. In vitro interactions within a biofilm containing three species found in bacterial vaginosis (BV) support the higher antimicrobial tolerance associated with BV recurrence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2022 Aug 1;77(8):2183–90.

108. Donmez HG, Sahal G, Akgor U, Cagan M, Ozgul N, Beksac MS. The relationship between the presence of HPV infection and biofilm formation in cervicovaginal smears. *Infection*. 2020 Oct 1;48(5):735–40.

## **Conclusão final**

---

Este trabalho apresentou a primeira caracterização metagenômica do microbioma brasileiro. A alta presença dos CSTs I, III e IV encontrados também reforça os achados anteriores nesta população. Além disso, a presença de diferentes mgSs de *L. iners* sugere seus potenciais efeitos positivos ou negativos para o ambiente vaginal. Ademais, o pH mais elevado associado aos mgCSTs de *G. vaginalis* enfatiza sua correlação com a VB. Por fim, a presença de ISTs nos mgCSTs de *G. vaginalis* também sugere que o ambiente vaginal pode influenciar o risco de coinfeções.

Em relação às espécies envolvidas na patogênese da VB e sua associação com o HPV de alto risco, sugere-se que as *Gardnerella* spp. afetam negativamente o ambiente vaginal, independentemente de outras bactérias associadas à VB, o que pode levar à persistência do HPV após 12 meses.