

GMD Facultad Cs. Médicas  
Biblioteca



TFEM 2846



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA DE GRADUADOS

CARRERA DE POSGRADO DE ESPECIALIZACIÓN EN  
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

DIRECTOR DE LA CARRERA: DR. ELIZALDE, EDUARDO

CENTRO FORMADOR: HOSPITAL PROVINCIAL DEL CENTENARIO

---

*DISBIOSIS VAGINAL COMO COFACTOR EN LA  
INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.  
CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA VAGINAL EN  
PACIENTES CONCURRENTES AL SERVICIO DE  
GINECOLOGÍA DEL HOSPITAL PROVINCIAL DEL  
CENTENARIO DURANTE 2022-2023.*

---

TUTOR: DRA. BONICELLI, CAROLINA

AUTOR: DRA. ANGELA PAULA OVIEDO

AÑO 2023

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres, María Inés y Ernesto, que a lo largo de estos años me transmitieron la importancia del estudio y la formación, como herramientas indispensables para ser libre. Este logro también es de ustedes.*

*A mi hermano Fernando por su apoyo incondicional y, por demostrarme que las adversidades no son muros sino puentes hacia nuevos horizontes.*

*A mis abuelos, que ya no están, pero que a través del recuerdo mantienen encendida la llama del esfuerzo, la tenacidad y el trabajo.*

*A mi tutora, Carolina Bonicelli quien, transitando una etapa única de su vida, me guio en la realización de esta tesis con total dedicación y compromiso.*

*A todas mis compañeras de residencia, por ayudarme a recolectar las muestras y ser un soporte fundamental a lo largo de estos años.*

*A Magui y Simba que, con su amor de cuatro patas, hicieron de mi casa un hogar.*

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	1
TABLA DE CONTENIDO.....	2
GLOSARIO .....	6
RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
GENERALIDADES.....	10
Infección por el Virus del Papiloma Humano .....	10
Microbiota Vaginal Normal.....	19
Caracterización y Composición de la Microbiota Vaginal .....	19
<i>Lactobacillus</i> : guardianes del ecosistema vaginal.....	23
Fluctuaciones de la Microbiota Vaginal y Factores Asociados .....	26
Técnicas para el Estudio y Caracterización de la MV .....	32
Disbiosis Vaginal: desequilibrio en la composición de la MV .....	35
Comensales como Patógenos.....	35
Diferencias Interspecies de <i>Lactobacillus</i> : ¿Disbiosis?.....	40
Asociación entre Disbiosis e Infección por VPH .....	44
Disbiosis Vaginal y Otras Infecciones de Transmisión Sexual .....	52
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS .....	56
RESULTADOS.....	60
CONCLUSIÓN.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	70

## ABREVIATURAS

**1H-NMR:** *Proton Nuclear Magnetic Resonance*, resonancia magnética nuclear de protones.

**ACO:** anticonceptivos orales combinados.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AMPD:** acetato de medroxiprogesterona de depósito.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**ARNr 16S:** ARN ribosómico 16S, componente de la subunidad menor (30S) de los ribosomas procariotas. Se utiliza para estudios filogenéticos, ya que su secuencia está altamente conservada entre especies de bacterias y arqueas.

**ASC-US:** células escamosas atípicas de significado indeterminado.

**ATP:** adenosín trifosfato.

**BAVB:** bacterias asociadas a vaginosis bacteriana.

**CCU:** cáncer de cuello uterino.

**CDC:** *Centers for Disease Control and Prevention*, Centros para el Control y Prevención de Enfermedades.

**CdC:** citolisina dependiente de colesterol.

**CIN:** neoplasia intraepitelial cervical.

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono.

**CST:** estados de comunidad microbiana.

**CVV:** candidiasis vulvovaginal.

**DIU-Cu:** dispositivo intrauterino de cobre.

**DV:** disbiosis vaginal.

**EGB:** *Streptococos* del grupo B.

**EMMPRIN:** inductor de metaloproteinasa de matriz extracelular vaginal.

**EPI:** enfermedad pélvica inflamatoria.

**EVB:** estados vaginales básicos.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno.

**HSIL:** lesión intraepitelial de alto grado.

**IFN/ IFN- $\gamma$ :** interferón, interferón-gamma.

**IL-17:** interleuquina 17.

**IL-1ra:** receptor antagonista de la interleuquina-1.

**ITS:** infecciones de transmisión sexual.

**kDa:** kilodalton, equivalente a 1000 daltons, unidad de masa atómica.

**KOH:** hidróxido de potasio.

**LCR:** *long control region*, región larga de control.

**LDH:** lactato deshidrogenasa.

**LIE:** lesión intraepitelial.

**LSIL:** lesión intraepitelial de bajo grado.

**MALDI-TOF MS:** *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry*, Espectrometría de Masas por Desorción/Ionización Láser asistida por Matriz.

**Mbp:** megabases, millones de pares de bases (Genética).

**MEB:** Microscopía Electrónica de Barrido.

**MIF:** factor inhibidor de la migración de macrófagos.

**MMP-8:** metaloproteinasa de matriz-8.

**MV:** microbiota vaginal.

**NGS:** *next generation sequencing*, secuenciación genética de alto rendimiento (segunda generación).

**NIH:** Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos.

**ORF:** *open reading frame*, marco abierto de lectura.

**p53:** proteína supresora de tumores.

**pH:** potencial de hidrógeno.

**PM:** postmenopausia.

**PMH:** Proyecto Microbioma Humano.

**pRB:** proteína del retinoblastoma, supresora de tumores.

**SIU-LNG:** dispositivo intrauterino liberador de Levonorgestrel.

**SST:** síndrome de shock tóxico.

**TGI:** tracto genital inferior.

**Th:** referido a células T *helper*, inmunidad adaptativa.

**THR:** terapia hormonal de reemplazo.

**TLR:** receptores tipo *toll-like*.

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa.

**UFC:** unidades formadoras de colonias de microorganismos.

**URR:** *upstream regulatory region*, unidad reguladora no codificada.

**VB:** vaginosis bacteriana.

**VHS:** Virus del Herpes Simple.

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

**VPH:** Virus del Papiloma Humano.

**VPH-AR:** Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo.

**VPH-BR:** Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo.

## GLOSARIO

**MICROBIOTA:** Término definido por primera vez por *Lederberg y McCray*<sup>[1]</sup>, como el conjunto de microorganismos presentes en un determinado nicho ecológico, tal como el cuerpo humano, en relación simbiótica mutualista con su huésped.

**METAGENOMA:** Conjunto de genes microbianos presentes en un entorno o ecosistema determinado.

**METAGENÓMICA:** Se define como el estudio de comunidades de microorganismos en su entorno natural, a través de la secuenciación de ADN de alto rendimiento o *next generation sequencing*, utilizando una base de datos de referencia conocida como *genoteca*.

**MICROBIOMA:** Este término se refiere a todo el hábitat, incluidos los microorganismos (bacterias, arqueas, eucariotas inferiores y superiores, y virus), sus genomas, y las condiciones ambientales circundantes. Esta definición se basa en la de "*bioma*", es decir, los factores bióticos y abióticos de ambientes dados. El metagenoma combinado con el medio ambiente constituye el microbioma.

**DISBIOSIS:** Estado de desequilibrio que, en el medio vaginal, se caracteriza por una microbiota polimicrobiana con baja prevalencia de *Lactobacillus spp.* y aumento de microorganismos anaerobios.

**FLORA/MICROFLORA:** La palabra microflora se ha utilizado por largo tiempo en la literatura científica y médica. Sin embargo, su significado no justifica su uso para describir comunidades microbianas asociadas con humanos. La definición de "flora" se remonta a mediados de 1600 y tiene su origen en el nombre en latín "*Flora*", la diosa romana de las flores, la fertilidad, los frutos y la juventud; y en la palabra latina "*flos*", que significa flor. Estos términos y sus orígenes demuestran que "microflora" se refiere a plantas y no microbios. Se sugiere entonces que para describir el conjunto de microbios que viven en un microhábitat se utilice el término "microbiota".

## RESUMEN

La infección persistente por el Virus del Papiloma Humano (VPH) es una condición *necesaria*, pero no *suficiente* para el desarrollo de cáncer de cuello uterino.

Los factores que promueven la persistencia viral, además de aquellos que activan las vías de transformación maligna, no se conocen del todo.

Evidencia emergente indica que el microbioma vaginal podría desempeñar un papel funcional (tanto protector como dañino) en la adquisición y persistencia de la infección por VPH y la posterior carcinogénesis.

Una comprensión detallada acerca de su composición y estructura en pacientes con Virus del Papiloma Humano podría ayudar a identificar conexiones causales; las que, por el momento, continúan siendo inciertas.

En este trabajo se realiza una revisión acerca de la microbiota vaginal, su constitución y fluctuaciones; y los estados de desequilibrio o *disbiosis*, como potencial cofactor de riesgo para la persistencia y progresión de la enfermedad por VPH.

Asimismo, se ofrece un estudio de casos y controles, cuyo objetivo fue caracterizar y evaluar la microbiota vaginal en pacientes con VPH, frente a mujeres sanas, que concurren al Servicio de Ginecología del Hospital Provincial del Centenario de la ciudad de Rosario, en el período comprendido entre abril de 2022 y abril de 2023.

Palabras Clave: Microbiota Vaginal-Disbiosis Vaginal-Virus del Papiloma Humano-*Lactobacillus*.

## INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano alberga comunidades ecológicas de organismos comensales, simbióticos y potencialmente patógenos, conocidos como *microbiota*, que residen en superficies y cavidades expuestas o no al ambiente externo<sup>[2]</sup>.

El impacto que éstas tienen en nuestro organismo fue revelado por estudios liderados por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) en el año 2008, en el marco del *Proyecto Microbioma Humano* (PMH). Sus resultados se centraron en dos hechos principales: el cuerpo humano está habitado por una microbiota muy diversa con mayor proporción de material genético que el propio huésped (relación 10:1); y, por otro lado, la utilización de nuevas técnicas moleculares de secuenciación, en lugar de aquellas dependientes de cultivo, han hecho posible la identificación de complejas comunidades de microorganismos, demostrando el gran impacto de la microbiota sobre el huésped a diferentes niveles: homeostasis metabólica, adquisición de nutrientes, desarrollo de inmunidad y protección contra patógenos, entre otros<sup>[2]</sup>.

Dirigiendo la atención al eje central de esta revisión, resulta fundamental recordar que la infección por el Virus del Papiloma Humano es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de lesiones intraepiteliales cervicales y carcinoma de cuello uterino<sup>[3]</sup>.

El cáncer de cuello uterino (CCU), la neoplasia más común asociada a infección, y su precursor, la lesión intraepitelial (LIE), son causados por diversos tipos de VPH. Pese a los esfuerzos por implementar estrategias de prevención primaria contra esta patología, el CCU es el cuarto tipo más común de cáncer entre mujeres sexualmente activas a nivel mundial<sup>[4]</sup>.

Desde el reconocimiento del VPH como agente etiológico de esta prevalente patología, se reforzaron las evidencias que indicaban que múltiples cofactores eran necesarios para completar la vía causal desde la infección por tipos virales oncogénicos al desarrollo de LIE de alto grado y, por último, carcinoma invasor.

Un creciente cuerpo de investigación sugiere que microbiota vaginal (MV) puede interferir en la probabilidad de persistencia de la infección por VPH y, en ocasiones, favorecer su progresión y la consiguiente carcinogénesis<sup>[3,5-7]</sup>.

En tal sentido, un microbioma alterado puede promover la formación de tumores en presencia de patógenos oncogénicos específicos a través de una multitud de mecanismos, incluida la liberación de genotoxinas que dañan el ADN del huésped, la promoción de inflamación crónica; y, una mayor susceptibilidad a la oncogénesis a través del incremento de estrés oxidativo, la creación de vías de señalización celular aberrantes, y la desregulación del sistema inmunológico. Sin embargo, la causalidad probada sigue sin estar clara<sup>[6]</sup>.

Por lo tanto, comprender el papel de las fluctuaciones de la MV durante las diversas etapas de la infección por VPH podría arrojar luz sobre los posibles mecanismos asociados con la carcinogénesis cervical.

El *objetivo* del presente estudio es ofrecer una revisión acerca de la composición de la MV, evaluando aquellos factores que la modulan y modifican; y establecer las condiciones necesarias para que se genere un estado de desequilibrio o disbiosis, constituyendo un potencial cofactor para la infección persistente por VPH.

En segunda instancia, se caracterizará la composición de la MV de pacientes con lesiones de bajo grado (LSIL) y alto grado (HSIL) por VPH (*casos*), en comparación con un grupo *control* (con citología o test de VPH negativos), que han concurrido al Servicio de Ginecología del Hospital Provincial del Centenario de la ciudad de Rosario, en el período comprendido entre abril 2022-abril 2023.

## GENERALIDADES

### Infección por el Virus del Papiloma Humano

El VPH, causa principal de condilomas genitales y CCU, es la infección de transmisión sexual (ITS) más común<sup>[8]</sup>.

Como se mencionó en la introducción, el CCU es el cuarto tipo más frecuente de cáncer entre mujeres, representando ~5% de la carga de cáncer en el mundo, con un estimado de 550.000 nuevos casos diagnosticados anualmente<sup>[4]</sup>.

Se estima que en nuestro país se diagnostican alrededor de 4.500 nuevos casos por año, siendo el tercero en prevalencia, según datos de 2020 (Ver Figura 1). Mueren casi 2.500 mujeres por esta enfermedad, correspondiendo a la cuarta causa de muerte por cáncer en este grupo. Presenta una incidencia cruda de 16,7 cada 100.000 individuos y un índice de mortalidad de 11 por 100.000<sup>[9]</sup>.

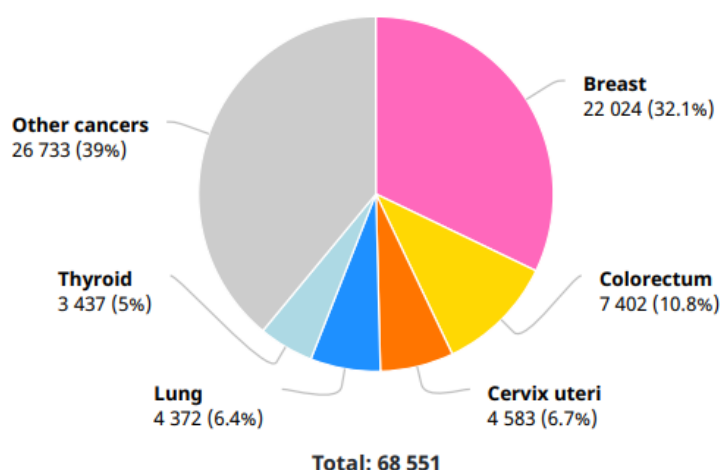
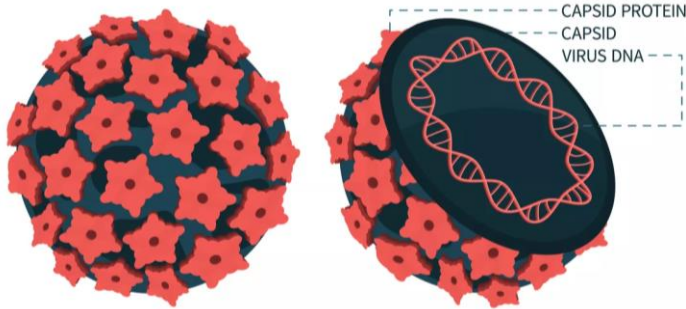


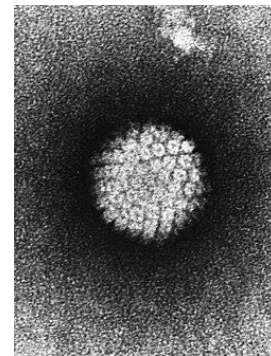
Figura 1. Número de nuevos casos de CCU en 2020, mujeres, todas las edades. Extraído de Organización Mundial de la Salud. Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC). 2020.

El VPH es miembro de la familia *Papillomaviridae*. Los tipos virales que generan afección genital pertenecen al género Alfa dentro del cual se identifican especies, que se encuentran relacionadas genéticamente y comparten propiedades biológicas. Así, por ejemplo, VPH 18 presenta características compartidas con VPH 45; y VPH 16 con VPH 31<sup>[10]</sup>.

A nivel molecular, el VPH se caracteriza por ser un virus pequeño, sin envoltura, con un diámetro de 50 a 55 nm. Las partículas virales consisten en una única molécula circular de ADN bicatenario de 7.900 pares de bases, que está unida a histonas celulares, y contenida en una cápside proteica icosaédrica compuesta por 72 capsómeros<sup>[11]</sup> (Ver Figuras 2 y 3).



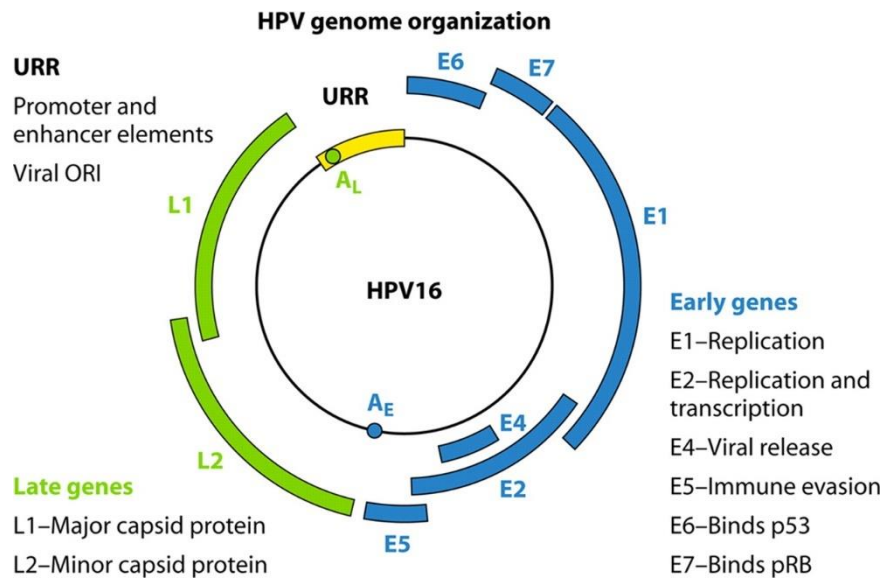
**Figura 2. Estructura externa e interna del VPH.** Extraído de *HPV and Cervical Cancer: Causes and Cures, 2021, Wondrium Daily* (<https://wondriumdaily.com>).



**Figura 3. Micrografía electrónica de un VPH teñido negativamente.** Extraído de *Laboratory of Tumor Virus Biology- NIH-Visuals Online# AV-8610-3067*.

Todos los papilomavirus comparten una estructura genética común que codifica aproximadamente ocho marcos abiertos de lectura (ORF, *open reading frame*)<sup>[12]</sup>. Su material genético se puede dividir en 3 secciones o regiones funcionales<sup>[11]</sup> (Ver Figura 4):

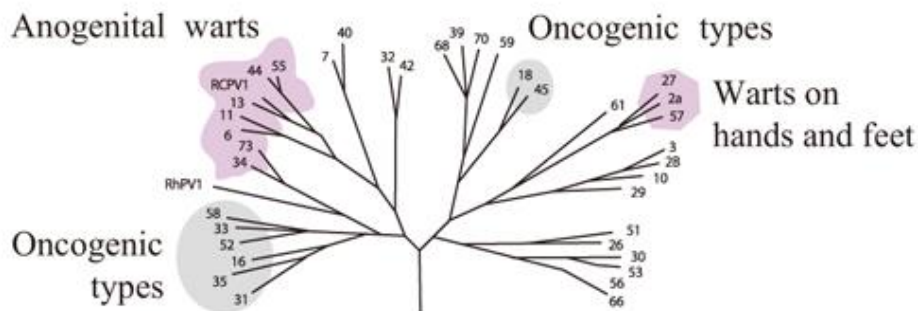
- **Región codificante tardía o late (L)** involucrada en la expresión de proteínas de la cápside requeridas para el ensamblaje viral: L1 (55 kDa de tamaño; 80% de la proteína viral total) y L2 (70 kDa). L1 es altamente inmunogénica, ya que es la más conservada; y, por tanto, ha representado el pilar para el desarrollo de vacunas profilácticas.
- **Región temprana o early (E)** codifica las proteínas necesarias para la replicación viral, que cumplen un importante rol en la transformación (oncogenicidad); E6 y E7 son las más importantes.
- **Región de control o unidad reguladora no codificada (LCR, *long control region*; o URR, *upstream regulatory region*),** regula la transcripción de las proteínas tempranas. Además, contiene la mayor variación genética entre un tipo viral y otro<sup>[10]</sup>.



**Figura 4. Estructura genómica del VPH.** Extraído de *Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus*. Stanley, M. ASM Journals, 2012 (<https://journals.asm.org>).

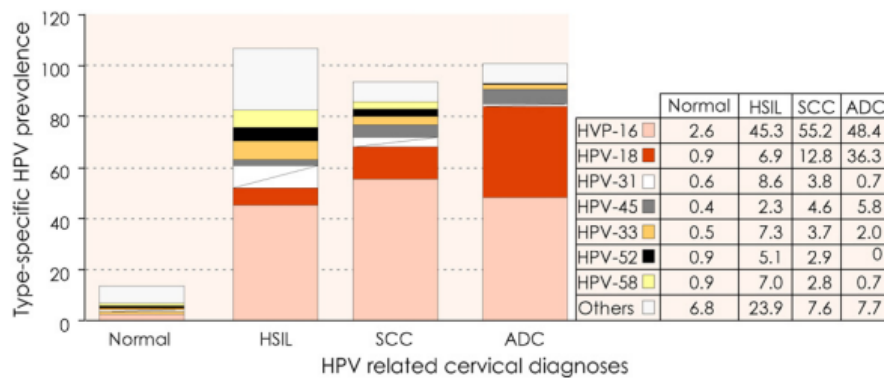
De los aproximadamente 200 genotipos de VPH, subdivididos en 14 especies, alrededor de 40 pueden infectar las células epiteliales (piel o mucosas) de las regiones anogenitales y otras áreas, por lo que se los conoce como *epiteliotrópicos*. Cada tipo de VPH difiere en más de un 10% en la región L1<sup>[11]</sup>.

De acuerdo al grado de asociación con tumores invasivos, estos pueden ser agrupados en VPH de bajo riesgo (VPH-BR) y alto riesgo (VPH-AR) oncogénico (Ver Figura 5). Los VPH-BR incluyen los tipos 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y 89, entre los más frecuentes, y se relacionan con la génesis de condilomas y LIE de bajo grado. De ellos, los más importantes son los tipos 6 y 11, que producen el 90% de verrugas genitales tanto en hombres como en mujeres<sup>[11]</sup>.



**Figura 5. Clasificación Filogenética del Género Alfa.** Extraído de de Villiers et al. *Classification of papillomaviruses*. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):17-27.

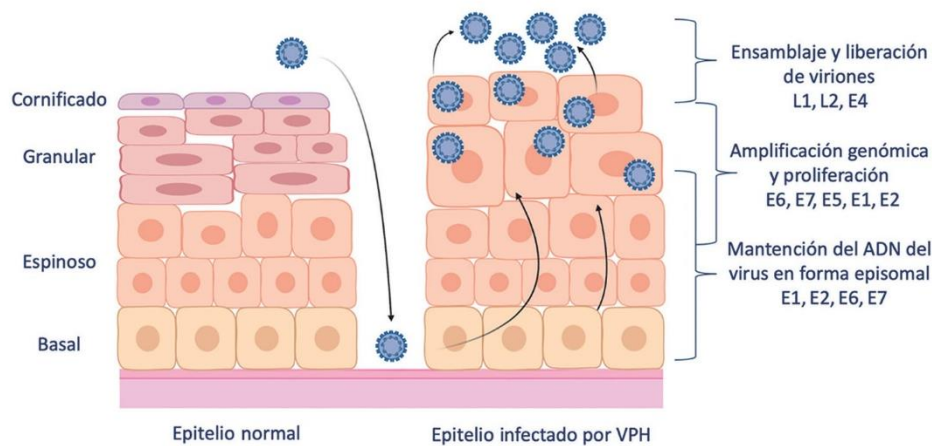
Al menos 15 tipos virales pueden causar CCU y de otros sitios, llamados oncogénicos o de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Casi el 100% de los casos de CCU son causados por uno de estos genotipos de alto riesgo. Los VPH 16 y 18 son los más virulentos, responsables de aproximadamente el 70% de todos los casos<sup>[13,14]</sup>. Luego, le siguen en orden de frecuencia los tipos 45 y 31 (cada uno responsable de alrededor del 5% de los casos de CCU en el mundo)<sup>[10]</sup> (Ver Figura 6).



**Figura 6. Prevalencia del VPH de tipo específico en todo el espectro de diagnósticos cervicales relacionados.** Extraído de Bosch FX, et al. *Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia.* Vaccine. 2008 Aug 19;26 Suppl 10:K1-16.

Asimismo, existen tipos virales de “riesgo indeterminado” (3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90, 91 ), es decir, aquellos cuya oncogenicidad aún no se ha definido completamente<sup>[11]</sup>.

El VPH infecta las células epiteliales basales de la mucosa anogenital a través de pequeñas abrasiones del epitelio (Ver Figura 7). Las uniones cervicovaginal y anorrectal donde el epitelio cilíndrico se transforma en epitelio escamoso a través de metaplasia, son especialmente vulnerables (*zona de transformación*), por ser sitios de replicación celular activa. Asimismo, el VPH evade el sistema inmunitario de múltiples maneras para evitar ser reconocido, y así infectar al huésped. En primer instancia, inhibe la síntesis de interferón (IFN), lo que debilita la respuesta inmunitaria antiviral. Además, por otra parte, la replicación del



**Figura 7. Ciclo de vida del VPH en el epitelio.** Extraído de Oliva, C., et al. *Role of Human Papillomavirus in Head and Neck. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello vol.81 no.3 Santiago, 2021.*

VPH no provoca citólisis, necrosis o viremia como ocurre con otros virus; las proteínas virales solo se liberan en grandes cantidades en las células terminales que están ya programadas para la muerte celular, eludiendo así la típica vigilancia inmunológica<sup>[11,12]</sup>.

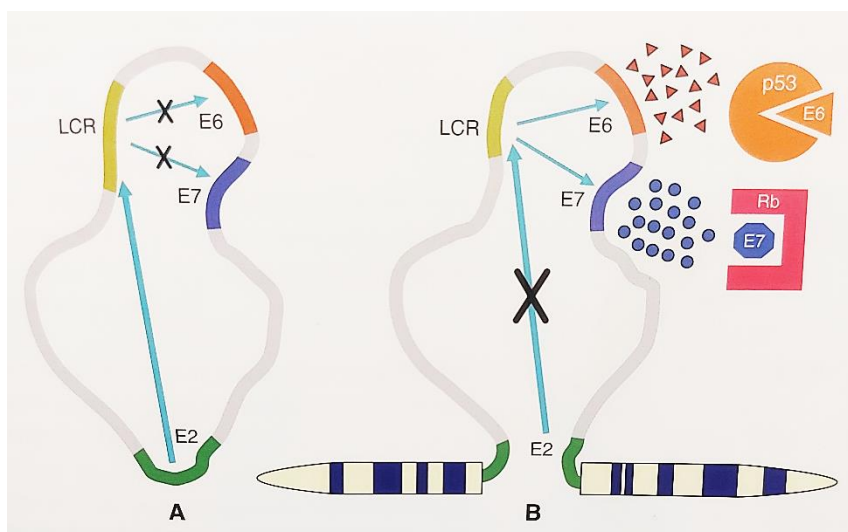
Una vez dentro de la célula basal, el VPH se dirige hacia el núcleo celular para utilizar la maquinaria de replicación. Las proteínas E1 y E2 se expresan en esta etapa y regulan la transcripción del ADN viral, con replicación de un bajo número de copias (50-100 copias/célula) en forma extracromosómica, en plásmidos llamados *episomas*. A su vez, E2 ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7. Durante esta etapa, el VPH se asegura que el ADN viral se distribuya difusamente por los queratinocitos basales proliferantes, sin activación de la inmunidad.

En el contexto del CCU asociado al VPH, el ciclo de vida viral se altera de dos maneras fundamentales. En primer lugar, los cambios histopatológicos progresivos que se producen en el epitelio cervical incluyen la pérdida de diferenciación terminal, que conduce a un estado celular incapaz de soportar el ciclo de vida viral completo. En segundo lugar, el genoma circular del ADN viral, que normalmente reside como un plásmido nuclear (*forma episomal*), se integra en el genoma del huésped (*forma integrada*)<sup>[7,10]</sup> (Ver Figura 8).

Dos consecuencias de la integración son la regulación positiva selectiva de los oncogenes virales E6 y E7, por delección de E2; y, una ventaja de crecimiento selectivo sobre las células que albergan el genoma viral como un plásmido nuclear<sup>[12]</sup>.

Las proteínas E6 y E7 tienen la capacidad de bloquear respectivamente a las proteínas supresoras tumorales p53 y proteína del retinoblastoma (pRB), anulando su capacidad de detectar la presencia viral; pero a su vez, impidiendo que se reparen los errores intrínsecos de la división celular, y permitiendo que una estirpe celular con ADN replicado y no reparado se perpetúe en el epitelio<sup>[10]</sup>. De hecho, se ha observado que la diferencia entre VPH-BR y VPH-AR, radicaría en la secuencia de E6 y su capacidad para degradar p53<sup>[11]</sup>.

Como consecuencia del bloqueo de pRB por E7, se produce la sobreexpresión de p16 (otra proteína reguladora del ciclo celular), cuya acción es ejercida mediante la inhibición de la cascada de ciclinas. Dicha sobreexpresión ha sido reconocida como indicador de ausencia de regulación del ciclo celular e integración del ADN del HPV con el ADN del huésped. Esto admite determinar un nuevo modelo biológico del desarrollo de CCU diferenciando entre *infecciones replicantes*, de carácter transitorio, vinculada a la expresión regulada de genes virales; e *infecciones transformantes*, persistentes, con pérdida de regulación de dichos genes<sup>[12]</sup>.



**Figura 8. Ciclo de vida del VPH en el epitelio. A. Forma episomal. B. Forma Integrada.** Extraído de Tatti, Fleider. *Enfermedades de la vulva, la vagina y la región anal: nuevos enfoques preventivos, diagnósticos y terapéuticos en la era de la vacunación.* 1er Edición. Buenos Aires, Argentina: 2013.

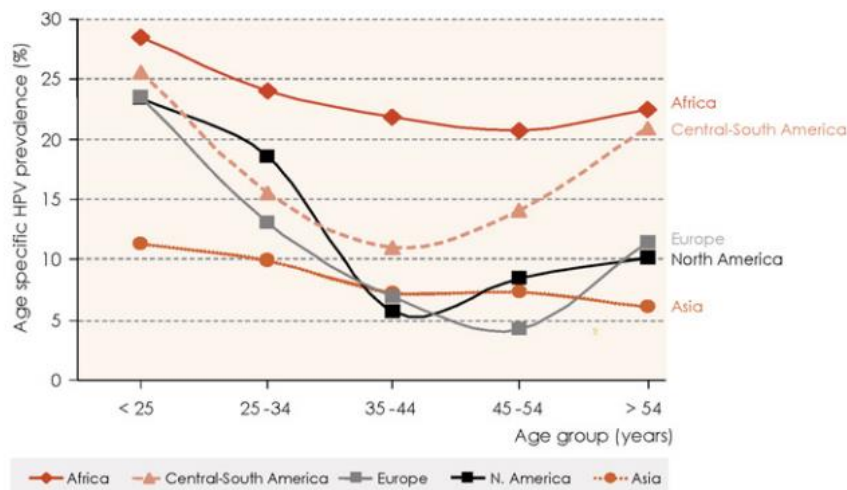
Este mecanismo especificado previamente explica la afirmación de que, en términos estrictamente biológicos, los VPH no son oncogénicos *per se*, sino que favorecen un estado celular susceptible a la transformación neoplásica<sup>[10]</sup>.

El desarrollo de CCU está precedido por una etapa preinvasora constituida por las lesiones intraepiteliales escamosas, que pueden definirse como el espectro de anomalías histológicas caracterizadas por alteraciones de la biología celular en grado variable, que se expresan morfológicamente en cambios nucleares y celulares.

A lo largo de los años, se han propuesto múltiples clasificaciones de las mismas, como un intento de estandarizar y objetivar los criterios diagnósticos anatomopatológicos y clínicos, y así ajustar la terapéutica a cada paciente<sup>[12]</sup> (Ver *Tabla 1*). La última de ellas, publicada en el año 2012, conocida como Proyecto LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-associated Lesions*), recomienda la clasificación de las LIE en bajo grado o LSIL, y alto grado o HSIL (verdadero precursor de CCU), siendo aplicable a todas las áreas anogenitales (cérvix=CIN, vulva=VIN, vagina=ValN, ano=AIN, periano=PaIN, pene=PeIN). A su vez, LAST contempla la categorización de las lesiones en función de la utilización de biomarcadores como p16<sup>[15]</sup>.

<b>TABLA 1. CORRELACIÓN ENTRE DISPLASIA/CIN/BETHESDA Y LAST</b>				
PAPANICOLAOU (1943)	OMS-REAGAN (1954)	RICHART (1960)	BETHESDA NIC (1988-2014)	LAST (2012)
CLASE I	NORMAL			
CLASE II	ATIPIAS INFLAMATORIAS			
CLASE III	DISPLASIA Leve	CIN 1	LIE bajo grado (incluye condiloma)	
	Moderada	CIN 2	LIE alto grado	
	Severa	CIN 3		
CLASE IV	CARCINOMA IN SITU			
CLASE V	CARCINOMA INVASOR			
			ASC-US/ AGC	
CIN: neoplasia intraepitelial cervical. LIE: lesión intraepitelial escamosa. ASC-US: células escamosas atípicas de significado incierto. AGC: células glandulares atípicas de significado incierto.				

En términos generales, la prevalencia de la infección por VPH es de aproximadamente 84,6% entre las mujeres antes de los 70 años, observando dos picos específicos por edad: 20-30% en menores de 25 años, disminuyendo a un 10% por encima de los 30 años; y una segunda etapa de riesgo en mayores de 45 años, que podría vincularse a cambios en la conducta sexual y/o al proceso de inmunosenescencia del sistema inmune en el período próximo a la perimenopausia<sup>[16]</sup> (Ver Figura 9).



**Figura 9. Prevalencia de VPH por edad a nivel mundial.** Extraído de Bosch FX, et al. *Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine. 2008 Aug 19;26 Suppl 10:K1-16.*

No obstante, el riesgo de progresión a cáncer es bajo, ya que el 60% remite en 12 meses y el 90% retrocede en 2 años<sup>[17,18]</sup>. En los casos restantes, el virus permanece latente en las células epiteliales, reanudando la replicación cuando se suprime el sistema inmunológico, o persiste como una infección activa que eventualmente puede causar displasia y cáncer<sup>[19]</sup>.

Más específicamente, las lesiones de bajo grado (LSIL-CIN1) tienden a retroceder espontáneamente, particularmente en pacientes jóvenes. Ostor y colaboradores han informado que CIN1 desaparece espontáneamente en el 60% de los casos, persiste en el 30% y puede progresar en el 10% de los casos. Por otro lado, CIN2 regresa espontáneamente en el 40%, persiste en otro 40% de los casos y puede progresar en el 20%; y, finalmente, CIN3 puede retroceder en el 33% y progresar en más del 12% de los casos<sup>[11,20]</sup>.

La citología (Test de Papanicolaou) y la detección del VPH (Test de ADN-VPH) son los dos métodos de tamizaje o screening actualmente recomendados, cuyo objetivo es detectar CCU o lesiones preneoplásicas en una etapa temprana<sup>[21]</sup>.

Se recomienda iniciar el tamizaje a los 3 años del comienzo de la actividad sexual en todo individuo con cuello uterino, independientemente de su género<sup>[21,22]</sup> (Ver Tabla 2).

Hasta los 29 años inclusive, lo recomendado es la citología, con un intervalo anual. Luego de 2 citologías negativas, puede pasarse a un intervalo cada 3 años (esquema 1-1-3). Individuos HIV (+), trasplantados e inmunocomprometidos, mantendrán el intervalo anual<sup>[21,22]</sup>.

En mayores de 30 años, se recomienda el tamizaje con prueba de VPH, debido a su mayor sensibilidad en comparación con la prueba de Papanicolaou, especialmente para la identificación de lesiones CIN2 y CIN3 (96% y 97% respectivamente), incluso en presencia de una especificidad más baja (89% versus 94% para la citología)<sup>[11,22]</sup>.

Si la prueba de VPH es negativa, podrá repetirse a los 5 años (debido a su elevado valor predictivo negativo); y si es positiva, se debe realizar triage con citología. En caso de no contar con las pruebas moleculares, es aceptable el tamizaje con citología sola, continuando con el intervalo anual y luego de 2 pruebas negativas, pasar a un intervalo cada 3 años<sup>[21]</sup>.

Se recomienda la finalización del screening en mayores de 65 años cuando se realiza con prueba de VPH; o mayores de 70 años, cuando se emplea solo citología. Esto aplica para inmunocompetentes, en ausencia de diagnóstico de LIE de alto grado/glandular en los últimos 25 años, y que hayan presentado tamizajes negativos en los últimos 10 años<sup>[21]</sup>.

<b>TABLA 2. RECOMENDACIONES PARA EL SCREENING DE CCU</b>				
<small>(Extraído de SAPTGlyC- SOGIBA- FASGO. Prevención primaria y secundaria del cáncer cervicouterino: “Manejo del tamizaje anormal y de las lesiones histológicas del cuello uterino”. 2022)</small>				
<b>TAMIZAJE</b>	<30 años y >3 años de IRS	≥30 años	>65 años	>70 años
<b>Prueba de VPH</b>	-	Cada 5 años	Discontinuar	-
<b>Citología sola</b>	1-1-3	Cada 3 años	-	Discontinuar

La infección por VPH requiere de la acción sinérgica de otros cofactores para la progresión neoplásica. Los factores de riesgo establecidos para la persistencia del VPH y la progresión a LIE incluyen el genotipo del VPH (particularmente VPH 16 y 18), la carga viral por unidad celular, la integración del ADN viral en el ADN celular, la infección concurrente por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), inmunosupresión y consumo de tabaco<sup>[6,23]</sup>.

Sin embargo, también pueden existir factores relacionados con el microbioma vaginal que influyan en la probabilidad de persistencia y progresión de la infección por VPH a LIE y CCU, que se analizarán a continuación.

## Microbiota Vaginal Normal

### Caracterización y Composición de la Microbiota Vaginal

Los componentes que forman parte de la MV representan uno de los elementos más importantes del tracto genital inferior (TGI) para enfrentarse a potenciales patógenos, entre los que se destaca el VPH.

En el medio vaginal, intervienen una serie de factores que permiten el establecimiento gradual de microorganismos, los que luego acompañarán a la mujer, en condiciones normales, durante toda la vida<sup>[24]</sup>.

Consisten clásicamente en una diversidad de gérmenes aerobios y anaerobios, siendo las especies de *Lactobacillus* los predominantes (Ver Tabla 3).

<b>TABLA 3. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA VAGINAL HABITUAL</b>		
<small>(Extraído de Prof. Dra. Farinati A, Dr. Orsini A. Flujo Vaginal (Vaginitis-Vaginosis-Cervicitis) Abordaje Integral del diagnóstico y tratamiento de las infecciones que producen flujo vaginal. 2da Edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Ascune; 2020)</small>		
<b>Grupo</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Prevalencia</b>
<b>Aerobios y Facultativos</b>		
<b>Bacilos Gram Positivos</b>	<i>Lactobacillus spp.</i>	45-88%
	<i>Corynebacterium spp.</i>	14-72%
	<i>Gardnerella spp.</i>	2-58%
<b>Cocos Gram Positivos</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	34-92%
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1-32%
	<i>Streptococcus</i> grupo B (EGB)	6-22%

	<i>Enterococcus spp.</i>	32-36%
	<i>Streptococcus</i> no hemolítico	14-33%
	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	17-36%
<b>Bacilos Gram Negativos</b>	<i>Escherichia coli</i>	20-28%
	Otras: <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>	2-10%
<b>Mollicutes</b>	<i>Mycoplasma hominis</i>	0-22%
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	0-58%
<b>Levaduras</b>		15-30%
<b>Anaerobios</b>		
<b>Bacilos Gram Positivos</b>	<i>Lactobacillus spp.</i>	10-43%
	<i>Eubacterium spp.</i>	0-7%
	<i>Bifidobacterium spp.</i>	8-10%
	<i>Propionibacterium spp.</i>	2-5%
	<i>Clostridium spp.</i>	4-17%
<b>Cocos Gram Positivos</b>	<i>Peptococcus</i>	76%
	<i>Peptostreptococcus</i>	56%
<b>Bacilos Gram Negativos</b>	<i>Prevotella bivia</i>	34%
	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	18%
	<i>Bacteroides</i> grupo <i>fragilis</i>	0-13%
	<i>Fusobacterium spp. (Sneathia)</i>	7-19%
<b>Cocos Gram Negativos</b>		2-27%

Históricamente, el estudio del ecosistema vaginal se basó en la evaluación microscópica y la posterior identificación de bacterias específicas por técnicas de cultivo. Sin embargo, se considera que la información brindada por tales metodologías es incompleta y fragmentaria<sup>[10,25]</sup>. Por otra parte, las herramientas microbiológicas utilizadas antes de la década de 1970 resultaron en una gran subestimación de la importancia de las bacterias anaerobias como constituyentes principales de la MV<sup>[26]</sup>.

Numerosos trabajos<sup>[27-34]</sup>, como el publicado por Lamont<sup>[35]</sup>, han demostrado que el ecosistema vaginal presenta una diversidad muy superior a lo que indicaban los primeros estudios clásicos. El uso de técnicas de secuenciación molecular de nueva generación ha revelado que las comunidades bacterianas vaginales se agrupan en tres a nueve grupos discretos, la mayoría de los cuales están dirigidos por *Lactobacillus*<sup>[36-38]</sup>.

Uno de los estudios más importantes que buscó caracterizar estas comunidades es el de Ravel et al<sup>[39]</sup>, que analizó la MV de 396 mujeres norteamericanas que representaban equitativamente cuatro orígenes étnicos (asiático, blanco, negro e hispano), mediante secuenciación de ARN ribosómico 16S (ARNr 16S).

El análisis reveló cinco grandes comunidades microbianas (*vaginitipos*) o tipos principales de *estados comunitarios* (CST- *Community Slate Type*)<sup>[39]</sup> (Ver Figura 10).



Figura 10. Estados de Comunidad Microbiana (CST). Extraído de Google, s.f., visitado septiembre 2023.

Cuatro de estos tipos de CST, que se hallaron en el 73 % de las mujeres, estaban dominados por diferentes especies de *Lactobacillus*. CST I estaba dominado por *L. crispatus*, mientras que los grupos II, III y V estuvieron dominados por *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*, respectivamente<sup>[39]</sup> (Ver Tabla 4).

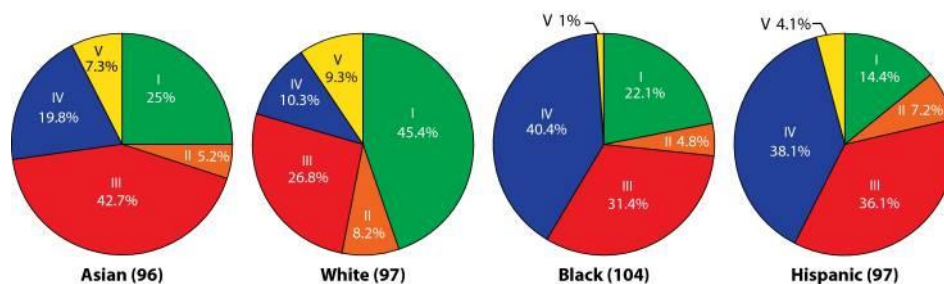
TABLA 4. ESTADOS DE COMUNIDAD MICROBIANA			
CST	PREVALENCIA	pH	TIPO DE BACTERIA
I	26,2%	4.0±0.3	<i>L. crispatus</i>
II	6,3%	5.0	<i>L. gasseri</i>
III	34,1%	4.4	<i>L. iners</i>
IV A	27%	5.3±0.6	<i>L. iners</i> <i>Gardnerella spp.</i> <i>A. vaginae</i> <i>Prevotella spp.</i>
IV B			<i>A. vaginae</i> <i>Leptotrichia spp.</i> <i>Mobiluncus spp.</i>
V	5,3%	4.4	<i>L. jensenii</i>

CST: Estado de Comunidad Microbiana. L.: *Lactobacillus*. G.: *Gardnerella*. A.: *Atopobium*.

Por su parte, CST I presentó un pH más bajo, mientras que CST IV tuvo el mayor valor. Curiosamente, las comunidades dominadas por especies de *Lactobacillus* que no fueron *L. crispatus* tenían valores de pH que oscilaban entre 4,4 (grupo III) a 5,0 (grupo II), lo que indicó que estas comunidades en su conjunto podrían no producir tanto ácido láctico como el grupo I. Sin embargo, se demostró que todas las comunidades contenían miembros con capacidad de producir lactato, incluyendo *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Streptococcus* y *Atopobium*, lo que sugiere que la producción de este compuesto puede conservarse pese a las diferencias en la composición del CST<sup>[39]</sup>.

Las restantes comunidades, que se encontraron en el 27% de las mujeres, formaban un gran grupo heterogéneo (CST IV), con gran proporción de anaerobios estrictos como *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Sneathia*, *Aerococcus* y *Mobiluncus*. Aunque las comunidades del grupo IV no estaban dominadas por *Lactobacillus spp.*, *L. iners* y *L. crispatus* se detectaron en un 78,7% y 51,9%, respectivamente. Estudios posteriores han subclasificado CST IV en los subgrupos IV-A y IV-B; este último con menos *Lactobacillus* y más grupos taxonómicos de bacterias anaerobias<sup>[27,40]</sup>.

Las proporciones de cada comunidad variaron entre los cuatro grupos étnicos, y estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P < 0,0001$ ). Además, el pH vaginal de diferentes grupos étnicos también difería, siendo mayor en mujeres hispanas y negras<sup>[39]</sup> (Ver Figura 11).



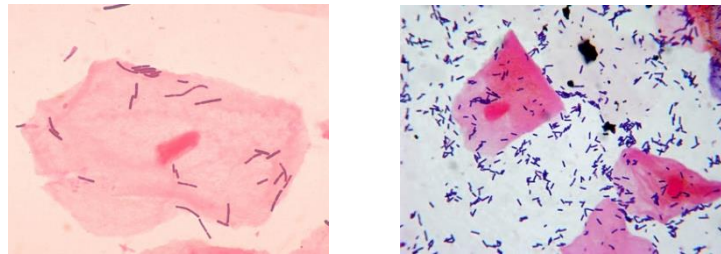
**Figura 11. Representación de grupos comunitarios de bacterias vaginales dentro de cada grupo étnico de mujeres.** Extraído de Ravel J, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4680-7.

Por último, el grupo 3 fue el que más se correlacionó con puntuaciones altas de Nugent e incluyó los siguientes filotipos: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Coriobacteriaceae*, *Dialister*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Prevotella*,

*Porphyomonas*, y *Sneathia*. Al contrario, las puntuaciones de Nugent más bajas se hallaron en los grupos que incluían principalmente filotipos de *Lactobacillus* (CST I, II, III y V)<sup>[39]</sup>.

### *Lactobacillus*: guardianes del ecosistema vaginal

*Lactobacillus* es un género de bacterias Gram positivas, facultativas o microaerófilas, baciliformes, no productoras de esporas, capaces de colonizar la mucosa vaginal, impidiendo el establecimiento o desarrollo excesivo de otros microorganismos que puedan volverse potencialmente patógenos para el huésped<sup>[2]</sup> (Ver Figuras 12 y 13). Son muy exigentes nutricionalmente y presentan un catabolismo estrictamente fermentativo<sup>[7]</sup>.



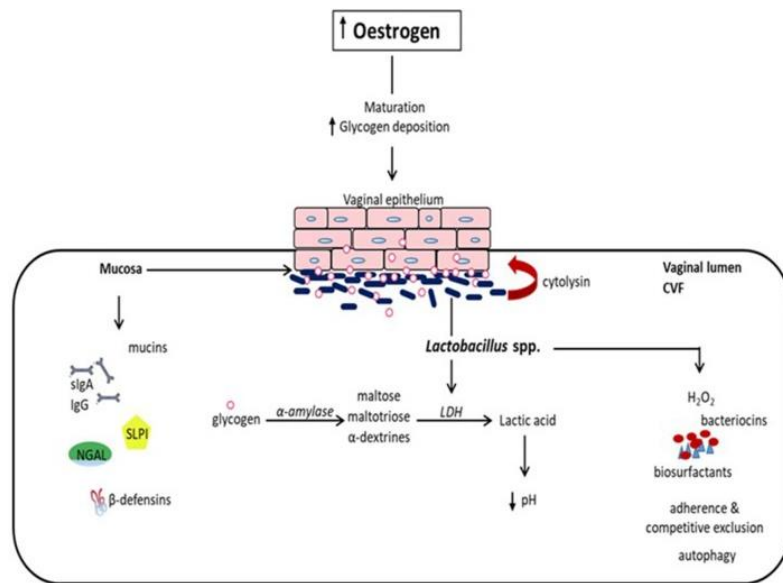
Figuras 12 y 13. *Lactobacillus* y células epiteliales escamosas vaginales. Extraído de Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL).

Su efecto protector depende de dos mecanismos:

- Adhesión específica a células epiteliales: se produce por el reconocimiento específico entre las estructuras superficiales de los *Lactobacillus* (adhesinas) y del epitelio (fibronectina), en una unión que se ve favorecida por un entorno de pH ácido. El resultado de esta asociación es la formación de una biopelícula que protege frente a la colonización por microorganismos indeseados, como *Gardnerella spp.*, *Candida albicans* o *Escherichia coli*<sup>[10]</sup>.
- Producción de compuestos antimicrobianos: la presencia de ácido láctico es clave para una homeostasis saludable y su producción proviene de dos fuentes diferentes: por el epitelio vaginal, como producto de su catabolismo, bajo estímulo estrogénico (principalmente la isoforma L-lactato que representa el 20% del ácido láctico total); y por la microbiota,

responsable de metabolizar aproximadamente el 80% del glucógeno, produciendo los dos isómeros de ácido láctico con predominio de D-lactato<sup>[41]</sup>.

El glucógeno es catabolizado por la enzima  $\alpha$ -amilasa en la luz vaginal a maltosa, maltotriosa y  $\alpha$ -dextrinas, que posteriormente son metabolizadas a ácido láctico, debido a la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) estimulada por *Lactobacillus*<sup>[42]</sup> (Ver Figura 14).

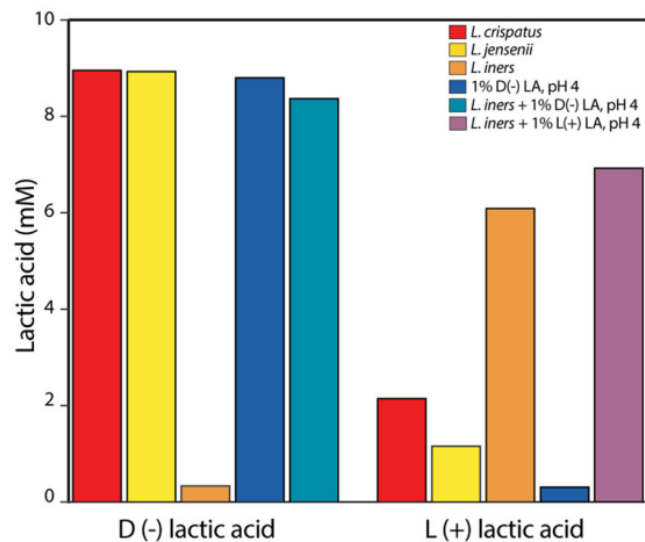


**Figura 14: Efecto eubiótico de estrógenos y especies de *Lactobacillus* en el medio vaginal.** Adaptado de Amabebe E, Anumba DOC. *The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli.* Front Med (Lausanne). 2018;5:181.

La existencia de ácido láctico en la luz vaginal tiene como consecuencia que el pH vaginal se mantenga ácido, a niveles de aproximadamente 3,8-4,5, generando un ambiente protector en la mucosa<sup>[43]</sup>. Al respecto, se ha demostrado que un pH >5 se asocia significativamente con un aumento del 10-20 % en el riesgo de positividad para el VPH<sup>[44]</sup>; y que, la proteína E5, responsable de la transformación viral, es particularmente susceptible al pH bajo<sup>[45]</sup>.

Los diferentes isómeros del ácido láctico tienen funciones únicas en el microambiente vaginal: el predominio de D- lactato conduce a una MV equilibrada. En cambio, L-lactato activa células inmunes y puede inducir a las células epiteliales vaginales a liberar citoquinas proinflamatorias<sup>[43]</sup>.

Se ha demostrado que *L. crispatus* produce cuatro veces más D- lactato que L-lactato; *L. jensenii* genera 9 veces más D-lactato; mientras que *L. iners* es productor casi exclusivo de la isoforma L. Por su parte, *L. gasseri* presenta poca liberación de D-lactato. A su vez, se ha comprobado que el isómero D producido por *L. crispatus*, aumenta la viscosidad del moco cervical, constituyendo un factor protector adicional<sup>[46]</sup> (Ver Figura 15).



**Figura 15: Concentraciones de ácido láctico D y L en los sobrenadantes de cultivo obtenidos de *Lactobacillus* spp. y soluciones químicas de ácido láctico D y L al 1%. Adaptado de Edwards VL, et al. The Cervicovaginal Microbiota-Host Interaction Modulates *Chlamydia trachomatis* Infection. mBio 2019;10(4).**

Otros compuestos producidos por *Lactobacillus* son el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y las bacteriocinas<sup>[47,48]</sup>. El  $H_2O_2$  es un agente oxidante, tóxico para las bacterias catalasa-negativas, como la mayoría de los anaerobios. Casi el 90% de *Lactobacillus* lo producen, y existe una correlación positiva con la ausencia de vaginosis bacteriana (VB). *L. jensenii* y *L. vaginalis* son las especies con mayor tasa de producción de  $H_2O_2$ <sup>[49]</sup>, mientras que *L. iners* es incapaz de generarlo.

Las bacteriocinas son péptidos que modifican la permeabilización de las membranas celulares<sup>[50]</sup>, pudiendo actuar sobre otros microorganismos, cumpliendo con el fenómeno de *interferencia bacteriana*. Se ha observado una capacidad superior de *L. iners* y *L. crispatus* para competir con otras bacterias por los recursos vaginales<sup>[35]</sup>.

## Fluctuaciones de la Microbiota Vaginal y Factores Asociados

Existe cierto consenso en la comunidad científica de que la composición de la MV tiene importantes fluctuaciones durante el ciclo de vida de la mujer, donde las hormonas sexuales esteroides juegan un papel clave<sup>[51–54]</sup>.

Los factores que intervienen en su composición se pueden categorizar como aquellos inherentes a la condición humana (conocidos como *factores no modificables*) y los relacionados con la conducta social o los hábitos, denominados *factores modificables* (Ver Tabla 5).

TABLA 5. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A DISBIOSIS	
FACTORES NO MODIFICABLES	FACTORES MODIFICABLES
Edad (status hormonal)	Anticoncepción
Etnia	Hábitos sexuales- Hábitos higiénicos
Polimorfismos genéticos	Medicación
	Dieta
	Estrés
	Tabaquismo

### Edad y Fisiología Hormonal

La composición de la MV sufre variaciones a lo largo de la vida de la mujer (Ver Figura 16).

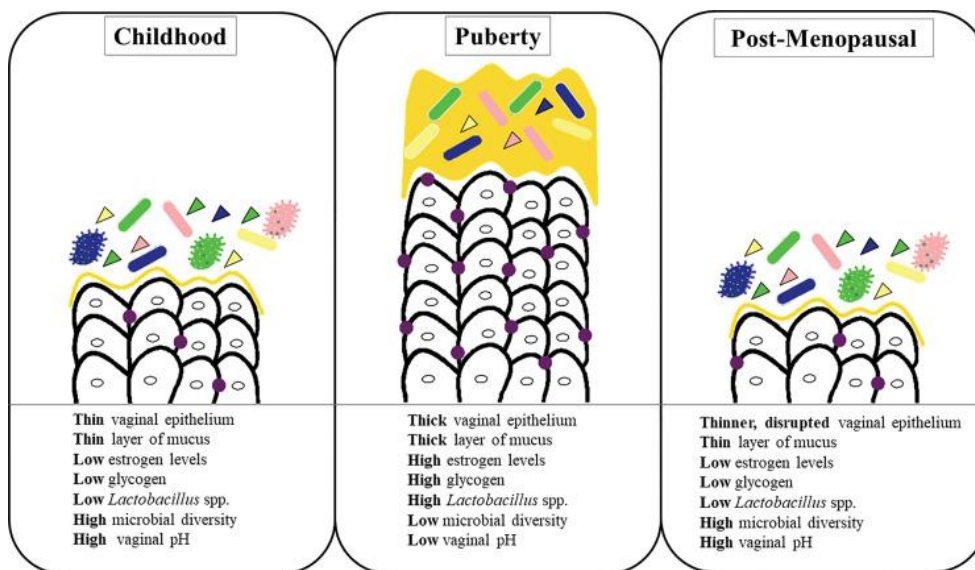


Figura 16: Cambios en el MV a lo largo de la vida de la mujer. Extraído de Abou Chacra L, et al. *Bacterial Vaginosis: What Do We Currently Know? Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jan 18;11:672429.

Durante las 2-4 primeras semanas de vida, existe un predominio de *Lactobacillus* por efecto de los estrógenos maternos, que median el engrosamiento de la mucosa vaginal con la consiguiente producción de glucógeno, y descenso del pH. Pasado este período, por metabolización de los esteroides maternos, se revierten todos los cambios mencionados, y disminuye la colonización por *Lactobacillus* hasta la menarca<sup>[55]</sup>.

En la infancia predomina la CST IV, con un pH neutro o elevado y una mucosa plana estratificada fina. Prevalece una colonización por difteroides como *Corynebacterium spp.* 78%, así como por *Staphylococcus epidermidis* (73%) y *Mycoplasma spp*<sup>[56]</sup>.

Entre los 8 y 13 años se producen los cambios puberales en vulva y vagina, gracias a la maduración de las glándulas suprarrenales y las gónadas. Esta nueva condición selecciona especies como *Lactobacillus spp.*, *Atopobium* y *Streptococcus spp*<sup>[56]</sup>. Se produce engrosamiento de la mucosa vaginal, con abundante descamación celular.

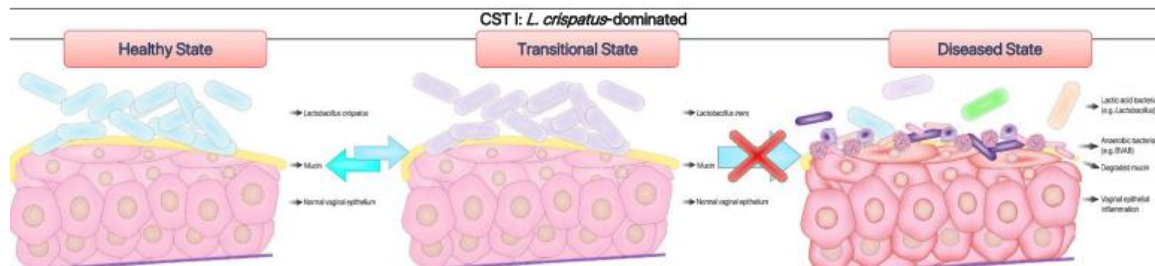
En mujeres en etapa reproductiva, las bacterias anaerobias superan a las aerobias en una relación 10:1. Posteriormente, con el aumento de la edad, el inicio de las relaciones sexuales y los embarazos, los microorganismos aerobios resultan más abundantes<sup>[10,25]</sup>. El pH vaginal alcanza su valor óptimo.

Entre las variaciones que puede sufrir el microbioma vaginal, existe evidencia de que el cambio de un estado comunitario a otro podría ser preferencial.

Asimismo, se ha comprobado que CST I tiende a ser la más estable<sup>[37,40,57]</sup>, y puede sufrir una transición temporal a CST dominada por *L. iners* o especies mixtas de *Lactobacillus* debido a la influencia hormonal, en particular del estradiol, la menstruación, el embarazo o debido a ciertas prácticas sexuales<sup>[58]</sup> (Ver Figura 17).

Durante la menstruación se observa un particular estado de vulnerabilidad, ya que aumenta la concentración de *Gardnerella spp.*, la diversidad microbiana, y disminuye *L. crispatus*. Además, los niveles de estrógeno y la producción de glucógeno están en su punto más bajo, lo que inhibe el crecimiento de *Lactobacillus*<sup>[59]</sup>. Para agravar este efecto, la mayor penetrabilidad de la mucosa

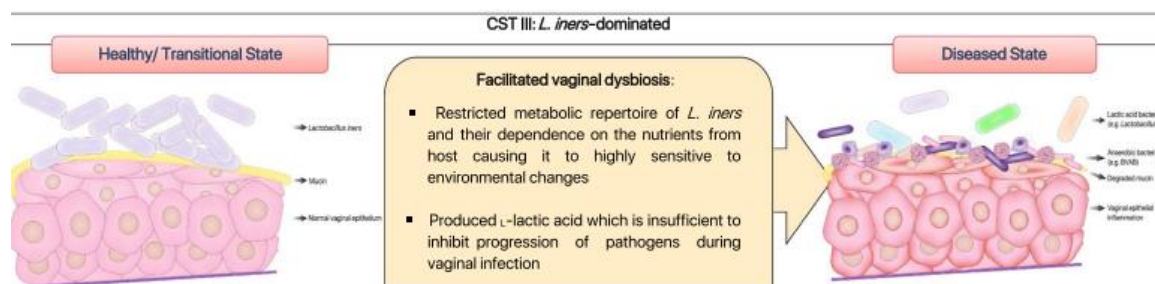
cervical durante la menstruación aumenta la probabilidad de ITS<sup>[60]</sup>. Esto estaría favorecido por una expresión reducida del receptor *toll-like* 4 (TLR-4) en este período, y TLR- 9, que detecta el ADN viral y está desregulado en la infección por VPH<sup>[61,62]</sup>.



**Figura 17: Ilustración esquemática de los diferentes CST basada en la literatura científica.** Adaptado de Chee WJY, et al. *Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. Microb Cell Fact* 2020;19(1):203.

CST II es dinámico, pero la transición al estado de enfermedad no se informa activamente. La transición a CST I puede ocurrir en raras ocasiones durante el embarazo<sup>[58]</sup>.

CST III es un estado de disbiosis vaginal facilitada, donde el repertorio metabólico restringido de *L. iners* y su dependencia de los nutrientes del huésped, lo hacen altamente sensible a los cambios ambientales<sup>[58]</sup> (Ver Figura 18). Se asocia a un ambiente proinflamatorio y a un pH elevado.



**Figura 18:** Adaptado de (Ídem referencia Figura 17).

CST IV es un estado de enfermedad. Se encuentra frecuentemente en pacientes con VB y mujeres sanas africanas. Aumenta el riesgo de ITS, trabajo de parto pretérmino, aborto espontáneo y enfermedad pélvica inflamatoria<sup>[58]</sup>.

CST V, dominado por *L. jensenii*, es estable y no se ha reportado ninguna transición hacia otro CST. Hay menos reportes acerca de las características de este CST<sup>[58]</sup>.

En la mujer postmenopáusica, el aumento del pH y la depleción de *Lactobacillus*, influyen en la estructura y funciones vaginales, contribuyendo a la aparición del síndrome genitourinario de la menopausia, que facilita la presencia de bacterias entéricas; y, recurrencias y reinfecciones, generalmente con microorganismos endógenos de baja virulencia<sup>[42,63]</sup>. Resulta interesante recordar el segundo pico de prevalencia de infección por VPH por edad, y la contribución de este cambio en tal sentido<sup>[16]</sup>.

Una mención aparte merece aquellas mujeres postmenopáusicas que utilizan terapia hormonal de reemplazo (THR), siendo esta la demostración más importante de influencia estrogénica, al producir la restitución de *Lactobacillus*<sup>[64–66]</sup>.

### Raza/Etnicidad

La adquisición de VB se ha asociado con la raza negra en los Estados Unidos<sup>[42,67]</sup>; y con poblaciones afrocaribeñas y aborígenes en Reino Unido y Canadá, respectivamente<sup>[67]</sup>.

Las mujeres de raza negra tienen mayor diversidad microbiana y menor probabilidad de colonización por *Lactobacillus* que las mujeres blancas<sup>[39]</sup>. Presentan menor proporción de *L. crispatus*<sup>[39,68,69]</sup>, y predominio de *L. iners* y bacterias anaerobias facultativas<sup>[39,69,70]</sup>.

La variación genética del huésped también puede afectar la composición del microbioma<sup>[71]</sup>. Polimorfismos en genes tales como el receptor antagonista de la interleuquina-1 (IL-1ra), o TLR4<sup>[72]</sup> podrían interferir. Como se mencionó previamente, se ha demostrado que los genotipos mutantes de TLR9 rs187084 y rs352140 se asociaron con infección persistente por VPH-AR, y un retardo en el clearance viral. Sin embargo, no se encontró asociación con los polimorfismos de TLR4<sup>[73]</sup>.

## Anticoncepción

El uso de estrógenos y progestágenos exógenos también se ha relacionado con cambios significativos de la inmunidad cervical y alteraciones de la MV que afectan la respuesta a las ITS<sup>[74]</sup>.

Las usuarias de anticonceptivos orales combinados (ACO), o de estrógenos solos (THR)<sup>[75]</sup>, son más propensas a ser colonizadas por *Lactobacillus* productores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en comparación con otros métodos<sup>[76,77]</sup>. Los efectos aislados de los progestágenos son mixtos y no concluyentes; y una revisión sistemática postula que disminuyen las especies de *Lactobacillus*, aumentando la diversidad y abundancia de bacterias asociadas a VB (BAVB)<sup>[75]</sup>.

En referencia a los dispositivos intrauterinos, estos originan cambios en la MV de tipo cuantitativo, debido, principalmente, al fenómeno inflamatorio que desencadena la presencia del hilo a nivel endocervical.<sup>[78,79]</sup> Algunos autores han asociado al SIU-LNG con la persistencia cervical de *C. trachomatis*<sup>[80]</sup>, y la colonización por *Candida spp*<sup>[81]</sup>. Esto podría deberse a un aumento del pH endocervical >4,5, prevalencia de neutrófilos endocervicales, citólisis vaginal<sup>[82]</sup>.

Los anillos vaginales podrían establecer cambios en la MV tanto por su aporte hormonal como por su comportamiento como “cuerpo extraño”. Sin embargo, un estudio observó un efecto protector de la MV en comparación con usuarias de ACO<sup>[83]</sup>.

Históricamente el uso prolongado de anticonceptivos hormonales se ha asociado con un mayor riesgo de CCU, aunque datos más recientes cuestionan esta asociación<sup>[6,84]</sup>. La anticoncepción oral promueve la ectopia cervical, lo que podría explicar la propensión a contraer el VPH. Sin embargo, hay múltiples factores asociados con la adquisición del VPH que a menudo también coinciden con el uso de estos fármacos (incluida la edad reproductiva, el comportamiento sexual y el tabaquismo), y podrían constituir factores de confusión<sup>[85]</sup>. Asimismo, los datos sobre las prácticas anticonceptivas y el riesgo de VPH también son difíciles de contextualizar teniendo en cuenta los efectos beneficiosos de los ACO sobre la MV<sup>[75,86]</sup>.

## Hábitos Sexuales

La relación entre la actividad sexual y la infección por VPH está bien establecida. Se sabe que el número creciente de parejas sexuales a lo largo de la vida y antecedentes de cualquier ITS están fuertemente asociados con la adquisición del Papilomavirus<sup>[87]</sup>.

Los factores principalmente asociados a un mayor riesgo de VB e ITS son:

- Mayor frecuencia de relaciones sexuales y múltiples o nuevas parejas<sup>[70,88,89]</sup>;
- Falta de uso de protección de barrera<sup>[89,90]</sup>;
- Sexo homosexual femenino<sup>[91,92]</sup>, directamente proporcional a un número elevado de parejas recientes (>1 en los últimos 3 meses<sup>[93]</sup>), y a la presencia de VB en la pareja sexual<sup>[94]</sup>;
- Coito vaginal inmediato luego de coito anal receptivo<sup>[88]</sup>.

Existe cierta controversia respecto de otros factores como el sexo oral receptivo<sup>[92]</sup>, si bien se ha aislado *Gardnerella spp.*, *Leptotrichia*, *Sneathia* y *Megasphaera* en cavidad oral<sup>[95]</sup>. El sexo receptivo digital (ya sea vaginal o anal) no parece estar relacionado con la VB<sup>[92]</sup>.

Hasta el momento, no hay estudios que investiguen directamente el vínculo entre VPH, la MV y los hábitos sexuales<sup>[87]</sup>.

## Hábitos y Gestión Menstrual

El tabaquismo es un factor de riesgo conocido para la prevalencia del VPH, y el desarrollo de LIE y CCU<sup>[96]</sup>. El principal metabolito de la nicotina, la *cotina*, se ha aislado en el moco cervical; y este hábito se asocia con daño epitelial cervical, modificación del ADN y respuestas inmunitarias suprimidas<sup>[97,98]</sup>. Asimismo, se ha relacionado con el aumento de la prevalencia de VB en varios estudios epidemiológicos y, en ocasiones, de forma dosis-dependiente<sup>[56,99]</sup>. Recientemente, se comparó el metaboloma vaginal de fumadoras y no fumadoras, observando mayor proporción de aminas biogénicas (cadaverina, putrescina y otras) en las primeras<sup>[99]</sup>.

Estudios del microbioma han revelado el sorprendente efecto de la dieta sobre la composición y función de la MV<sup>[100]</sup>, y se han descrito ciertos hallazgos concordantes con la asociación entre nutracéutica y VPH. Niveles elevados de albúmina, vitamina A, D, E, folato y antioxidantes constituyen un factor protector de la MV con menor riesgo de adquisición de VPH<sup>[101]</sup>; mientras que su déficit se asocia a VB<sup>[102,103]</sup> e infección por VPH-AR<sup>[104]</sup>. A su vez, se ha encontrado una relación directa entre el aumento de grasa y mayor índice glucémico en la dieta, con VB<sup>[102,105]</sup>; mientras que, la eliminación del VPH-AR se asoció con un alto consumo de frutas, mariscos y proteínas vegetales<sup>[106]</sup>.

El uso de productos de higiene femenina podría alterar la barrera inmune vaginal teniendo un impacto en la integridad celular. La utilización de tampones con poliacrilato se ha asociado al *síndrome de shock tóxico estafilocócico* (SST)<sup>[107]</sup>; mientras que se ha observado una mayor colonización vulvovaginal con bacterias entéricas en aquellas mujeres que utilizan apósitos o protectores de uso diario<sup>[108]</sup>.

Con respecto al uso de copa menstrual, se han reportado 5 casos de SST<sup>[109]</sup>, y en una investigación publicada en mayo de 2023 se comprobó una asociación potencial con un incremento de infecciones fúngicas<sup>[110]</sup>.

Las duchas vaginales también se relacionan con un mayor riesgo de VB<sup>[111]</sup>; y como lo demuestra un estudio que involucró 49.300 mujeres estadounidenses, podrían propiciar el desarrollo de LIE, ya sea por alteración de la MV o el uso de productos con ftalatos o compuestos orgánicos volátiles potencialmente cancerígenos<sup>[112]</sup>. Las consecuencias de otros procedimientos intravaginales (uso de jabón, papel, talco) no son totalmente bien entendidos<sup>[112,113]</sup>, siendo algunos de ellos más asociados con riesgo de disbiosis (uso de hidratantes o lubricantes a base nonoxynol-9)<sup>[114]</sup>.

## Técnicas para el Estudio y Caracterización de la MV

Se han realizado múltiples investigaciones a nivel mundial con el objetivo de caracterizar la MV en mujeres en edad fértil y, en particular, las especies predominantes de *Lactobacillus*.

Con el avance tecnológico en secuenciación masiva se han desarrollado nuevos métodos que pueden secuenciar directamente el ADN fragmentado o amplificado sin necesidad de clonar. Estos métodos se conocen como métodos de segunda generación y se agrupan en la definición de *next generation sequencing* (NGS). Presentan muchas ventajas, entre ellas un menor costo, una reducción del tiempo de preparación y del proceso de secuenciación, una aceptable calidad de los datos y, sobre todo, la generación de una gran cantidad de secuencias.

Sin embargo, requiere un paso previo de amplificación por PCR que puede inducir a error, sobre todo por sobreestimar las poblaciones mayoritarias. Aun así, estas técnicas representan, en la actualidad, el estándar para el estudio de las comunidades microbianas, particularmente la microbiota humana<sup>[115]</sup>.

En el año 2017, Foschi et al., se propusieron evaluar la integración de diferentes enfoques moleculares: genotípico (secuenciación de ARNr 16S), proteómica (*MALDI-TOF MS*, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry*) y metabolómica (*<sup>1</sup>H-NMR*, *Proton Nuclear Magnetic Resonance*), para la taxonomía y caracterización metabólica de especies de *Lactobacillus*. El alto poder discriminatorio de *MALDI-TOF MS* para la identificación de especies fue subrayado por la excelente concordancia con el análisis genotípico (97,5%)<sup>[116]</sup>.

La espectrometría de masas (*MALDI-TOF MS*), es una técnica utilizada para la identificación de microorganismos mediante la creación de un espectro basado en el perfil de proteínas, que es único para una especie dada, lo que ha permitido la creación de bases de datos<sup>[117,118]</sup>.

En el *World Microbe Forum* de 2021, investigadores de Portugal y China, expusieron los datos obtenidos mediante *MALDI-TOF MS* y secuenciación de péptidos y proteínas, a partir de muestras de flujo vaginal. *Lactobacillus spp.* fueron identificados en el 85% de los casos; y se aislaron siete especies: *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. paragasseri*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. delbruecki* y *L. mulieris*<sup>[119]</sup>. Adicionales estudios compararon los hallazgos obtenidos por secuenciación y espectrometría, concluyendo que *MALDI-TOF MS* demostró ser una herramienta confiable y rápida para identificar *Lactobacillus* a nivel de especie<sup>[120,121]</sup>.

En tal dirección, se destaca la investigación llevada a cabo por Susuki et al. en el Hospital de Clínicas de la ciudad de Buenos Aires, cuyo objetivo fue evaluar la disfunción vaginal mediante BACOVA y caracterizar la microbiota lactobacilar por espectrometría de masa, en pacientes con lesiones citológicas de alto (HSIL) y bajo grado (LSIL) por VPH, en comparación con un grupo control<sup>[122]</sup>.

El Balance del Contenido Vaginal (BACOVA) constituye una herramienta de apoyo para el diagnóstico de disfunción vaginal en el laboratorio microbiológico, utilizada desde el año 2004, bajo normativas de la Fundación Bioquímica Argentina. Este sistema genera el nuevo concepto de Estados Vaginales Básicos (EVB), que define con un alto valor predictivo el estado funcional vaginal, a partir del estudio morfológico del contenido vaginal y la reacción inflamatoria<sup>[123]</sup>.

Así surgen 5 EVB: I-Microbiota Normal, II-Microbiota Normal con Reacción Inflamatoria Vaginal significativa, III-Microbiota Intermedia, IV-Vaginosis Bacteriana y V-Vaginitis Microbiana Inespecífica. BACOVA contribuye con un 75 % de valor predictivo positivo en vaginitis convencionales (Tricomoniasis y vulvovaginitis por levaduras); y con un 100 % para Vaginosis Bacteriana<sup>[123]</sup>.

En la investigación, Susuki et al. analizaron 760 pacientes a lo largo de 6 años, y las clasificaron según rango etario en grupo 1 (n=175, 18 a 24 años) y grupo 2 (n=585, 25 a 50 años).

Se observó una asociación estadísticamente significativa entre LSIL y HSIL con disbiosis vaginal en el grupo 1 (P=0,047 y P=0,05, respectivamente). Las pacientes HSIL tuvieron una disminución de *L. crispatus* (21,4%) y una alta prevalencia de *L. jensenii* (46,2%)<sup>[122]</sup>, observando un mayor grado de desbalance vaginal.

## Disbiosis Vaginal: desequilibrio en la composición de la MV

Muchas veces el estado de **eubiosis** se ve alterado por modificaciones en las concentraciones de microorganismos, produciendo una situación de desequilibrio o **disbiosis** de la microbiota<sup>[124]</sup>.

La disbiosis vaginal (DV) se describe para tres alteraciones principales en el medio ambiente vaginal<sup>[125-127]</sup>: un cambio en la composición reemplazando *Lactobacillus* por anaerobios facultativos; la producción de compuestos amino y; un aumento en el pH >4,5. Estas características favorecen el desarrollo de microorganismos oportunistas que se comportan como patógenos, ya sea que se encuentren habitualmente en la vagina o que sean exógenos<sup>[127]</sup>.

Por lo tanto, esta diversidad en la MV, también llamada *microbioma no saludable*, es más susceptible a enfermedades, incluida la adquisición de ITS y resultados reproductivos y obstétricos desfavorables<sup>[37,57,128]</sup>.

## Comensales como Patógenos

### Vaginosis Bacteriana

La condición clínica más común y mejor estudiada de DV es la Vaginosis Bacteriana, generalmente compatible con CST III-IV<sup>[129]</sup>. Su prevalencia resulta difícil de estimar, pero oscila entre 15-30%, ascendiendo a 51% en la raza negra<sup>[91]</sup>.

Es una patología endógena polimicrobiana, caracterizada por un pH elevado (rango 5-5,5) y la presencia de varias aminas primarias y poliaminas (*trimetilamina*), que pueden detectarse por la presencia del característico olor a pescado (*fishy odor*) que emiten después del añadido de hidróxido de potasio (KOH)<sup>[24]</sup>. El término *vaginosis* permite diferenciarla de las *vaginitis*, ya que no hay reacción inflamatoria.

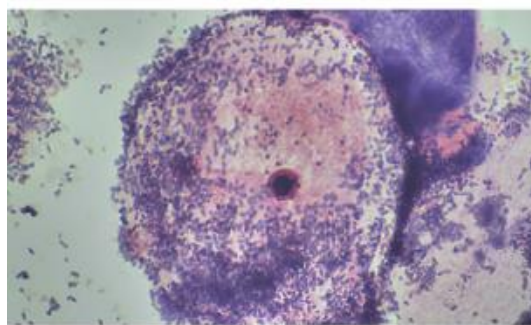
Generalmente es de curso benigno, pero puede asociarse a complicaciones como enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), incremento de carga viral en pacientes VIH, mayor riesgo de parto pretérmino, entre otras<sup>[24]</sup>.

Este estado disbiótico puede generarse cuando ciertas condiciones interrumpen, modifican, reducen, bloquean, fluctúan o agotan los *Lactobacillus* dominantes<sup>[130]</sup>, resultando en una menor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ácido láctico, lo que

facilita un reemplazo progresivo por otros constituyentes de la MV, que en conjunto reciben el nombre de complejo GAMB (*Gardnerella spp.*; anaerobios como *A. vaginae*, *Prevotella*, *Sneathia*; *Mobiluncus*; *M. hominis* y *U. urealyticum*, entre otras BAVB<sup>[131]</sup>. Se han propuesto dos teorías para comprender este estado disbiótico. La primera se refiere a la desaparición de *Lactobacillus* por factores exógenos o endógenos; mientras que la segunda explica que serían atacados por un tipo de virus específico (bacteriófagos), volviéndolos incapaces de recolonizar la vagina, y facilitando el sobrecrecimiento anaerobio<sup>[10]</sup>.

Hasta hace poco, *Gardnerella vaginalis* era la única especie presente en el género *Gardnerella*. En 2019, se propusieron trece nuevas especies; y la descripción de *G. vaginalis* fue reducida y modificada. Para reflejar la taxonomía actual, se utilizará *Gardnerella spp.* en lugar de *G. vaginalis*<sup>[130]</sup>.

Se trata de un bacilo Gram variable, inmóvil y anaerobio facultativo<sup>[10]</sup>. Su patogenicidad depende de sus factores de virulencia, como la actividad sialidasa, su toxina *vaginolisina* que le permite su adhesión a las células epiteliales vaginales (*clue cells*), y la formación de biopelículas<sup>[124,132]</sup> (Ver Figura 19). Estudios recientes han demostrado que *Gardnerella spp.* se encuentra en el 40% de las mujeres con MV sano, postulando que constituye una causa necesaria pero no suficiente para el desarrollo de VB, por lo que se infiere que solo algunas especies estarían involucradas en el desarrollo de DV<sup>[133]</sup>.



**Figura 19. Tinción de Gram, 1000x. Clue cell.** Adaptado de Vieira-Baptista P, et al. International Society for the Study of Vulvovaginal Disease recommendations for the diagnosis and treatment of vaginitis. 2023.

Tradicionalmente, el diagnóstico se realiza por los criterios de Amsel: pH >4-4,5, descarga vaginal homogénea, prueba de aminas positiva y presencia de *clue cells*<sup>[134]</sup>. La elevación del pH es el criterio diagnóstico más sensible de VB (98%), mientras que el test de aminas positivo tiene un elevado valor predictivo positivo<sup>[24]</sup>.

El diagnóstico de laboratorio se basa en la tinción de Gram de la muestra de flujo vaginal y su análisis según los criterios de Nugent, que considera los morfotipos bacterianos estableciendo un sistema de puntuación<sup>[135]</sup>.

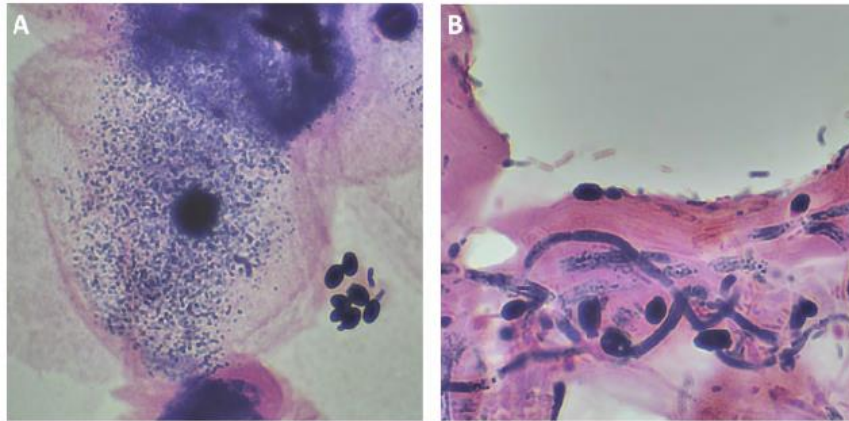
Se ha comprobado que la presencia de VB se asocia con tasas más altas de infección por VPH<sup>[136]</sup>, con retraso en el clearance viral<sup>[137]</sup>; y, en dirección opuesta, la infección por VPH-AR persistente duplica el riesgo para la génesis de VB<sup>[138]</sup>.

### Candidiasis Vulvovaginal (CVV)

La candidiasis vulvovaginal ocurre en el 75% de las mujeres al menos una vez en la vida, mientras que aproximadamente el 5-10% desarrollará recurrencias (más de cuatro episodios anuales)<sup>[139,140]</sup>. Se ha demostrado su asociación con diabetes, uso de antibióticos, aumento del nivel de estrógenos (embarazo, premenstruo y ACO), inmunodepresión y el inicio de relaciones sexuales<sup>[141,142]</sup>. No obstante, no se conoce su real incidencia por el sobrediagnóstico y la automedicación.

Existen diferentes especies de *Candida* que pueden afectar el TGI. *Candida albicans* es la especie dominante (involucrada en más del 80% de los casos), en tanto que *Candida glabrata* es la segunda en frecuencia (en postmenopáusicas, diabéticas y pacientes HIV), junto con *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*. Finalmente, variantes del Complejo *albicans* como *C. africana* y *C. dubliniensis* también desempeñan un papel en la producción de VVC<sup>[24,130]</sup>.

*Candida albicans* es un organismo comensal dimórfico del tracto intestinal y genital, ya que se encuentra en humanos en fases fenotípicas distintas. En general, los blastoporos representan el fenotipo asociado a la transmisión o propagación de infección, y se relacionan con la colonización asintomática de la vagina. Por el contrario, la pseudohifas se asocian, aunque no exclusivamente, con enfermedad sintomática<sup>[24]</sup> (Ver Figura 20).



**Figura 20. Tinción de Gram, 1000x. A Blastosporos. B Pseudohifas y blastosporos. Adaptado de Vieira-Baptista P, et al. International Society for the Study of Vulvovaginal Disease recommendations for the diagnosis and treatment of vaginitis. 2023.**

La CVV puede clasificarse, según el sistema propuesto por el CDC, en no complicada y complicada (esta última incluye CVV recurrente, crónica y las no producidas por *C. albicans*)<sup>[130]</sup>.

Clásicamente, ocurre en asociación con un aumento significativo en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Candida*. Existe una relación inversa entre *Lactobacillus* y *Candida spp.*, de modo que, cuando los primeros son eliminados por tratamientos antimicrobianos (principalmente betalactámicos y tetraciclinas<sup>[143]</sup>), las levaduras se hacen cargo del vacío microbiológico. Esta observación sugiere la existencia de un efecto antagónico de control de *Lactobacillus* sobre las especies de *Candida*<sup>[26]</sup>.

Algunas explicaciones plausibles sobre cómo *C. albicans* cambia de mero colonizador a patógeno incluyen, como ya se mencionó, la DV, la expresión de factores de virulencia (es decir, formación de hifas y biopelículas), y la producción de enzimas proteolíticas que generan inmunotoxicidad vaginal<sup>[141,144]</sup>.

A menudo, hay exacerbación de los síntomas en los 5-7 días previos a la menstruación. La secreción vaginal no siempre está presente, aunque suele describirse como blanca, espesa, con grumos (tipo leche cortada). El pH es el habitual, y la prueba de aminas es negativa<sup>[24]</sup>.

El diagnóstico es clínico, debiendo realizar cultivo e identificación de especie en los casos de fracaso terapéutico o candidiasis complicada<sup>[24]</sup>.

## Vaginitis Aeróbica

La vaginitis aeróbica (VA) fue caracterizada por primera vez en 2002, como una condición diferente con respecto a la VB, con ciertas características distintivas<sup>[145]</sup>.

Se la define como una disrupción de la MV habitual, por una disminución en la cantidad de *Lactobacillus*, acompañada de inflamación severa, maduración epitelial deficiente (con alto índice descamativo) y la presencia de especies entéricas principalmente aeróbicas, incluido el EGB, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*<sup>[24,146-148]</sup>.

Se trata de una infección endógena cuya prevalencia no es aún muy clara, oscilando entre 5-12%<sup>[146,149]</sup>. Podría asociarse a resultados adversos perinatales<sup>[148]</sup>.

Respecto al cuadro clínico, el 70% de estas mujeres muestra un flujo vaginal inespecífico, generalmente amarillo, espeso, de aspecto purulento; y el 12% manifiesta dispareunia, con dolor predominantemente a nivel del introito. El pH se encuentra elevado, por encima de 4,5. La prueba de aminas puede ser positiva, pero lo más frecuente es la presencia de un olor fecaloide<sup>[24,81]</sup>. Tiende a la recurrencia, y suele participar con otros agentes etiológicos, dando lugar a las vaginitis mixtas, en particular, la condición VA/VB<sup>[24]</sup>.

El examen microscópico es el elemento que orienta hacia el diagnóstico: la presencia de respuesta inflamatoria, el aumento de células parabasales y, en particular, la disminución o ausencia de lactobacilos y su reemplazo por flora cocoide o cocobacilar<sup>[24]</sup>.

Múltiples estudios han demostrado una fuerte asociación de esta entidad con patología cervical por VPH, aún superior a la observada para VB<sup>[150]</sup>, concluyendo que la VA constituye un importante factor de riesgo para infección por VPH y el desarrollo de LIE<sup>[151,152]</sup>.

## Diferencias Interespecies de *Lactobacillus*: ¿Disbiosis?

La introducción de los CST ha llevado a la comprensión de que las especies de *Lactobacillus* no son igualmente protectoras contra los patógenos, y en ocasiones, pueden constituirse como responsables de un cuadro patológico<sup>[153]</sup>.

Una especie muy interesante es *Lactobacillus iners*. Forma parte de la MV y, de hecho, es una de las predominantes en mujeres en edad fértil; sin embargo, su papel es ambiguo, presentando diferentes patrones de expresión en condiciones normales y en estados disbióticos (Ver Esquema 1 y Figura 21).

En comparación con otras especies de *Lactobacillus*, *L. iners* tiene requisitos nutricionales más complejos y una morfología Gram-variable. Presenta un genoma inusualmente más pequeño (~1.3 Mbp, frente a otras especies con genomas de 3-4 Mbp)<sup>[129,154,155]</sup>. Esto podría deberse a eventos evolutivos que le permiten una supervivencia óptima en la vagina. Por lo tanto, *L. iners* podría ser un genuino simbionte vaginal, pero también un potencial patógeno oportunista<sup>[155]</sup>.

Produce una citolisina dependiente de colesterol (CdC) llamada *inerolisina*, similar a la vaginolisina de *Gardnerella spp.* (68,4% de similitud<sup>[156]</sup>), con capacidad de perjudicar la integridad del epitelio vaginal y cervical<sup>[155]</sup>. Esta CdC está activa con un pH entre 4,5 y 6,0, que corresponde al nivel encontrado en VB<sup>[154]</sup>.

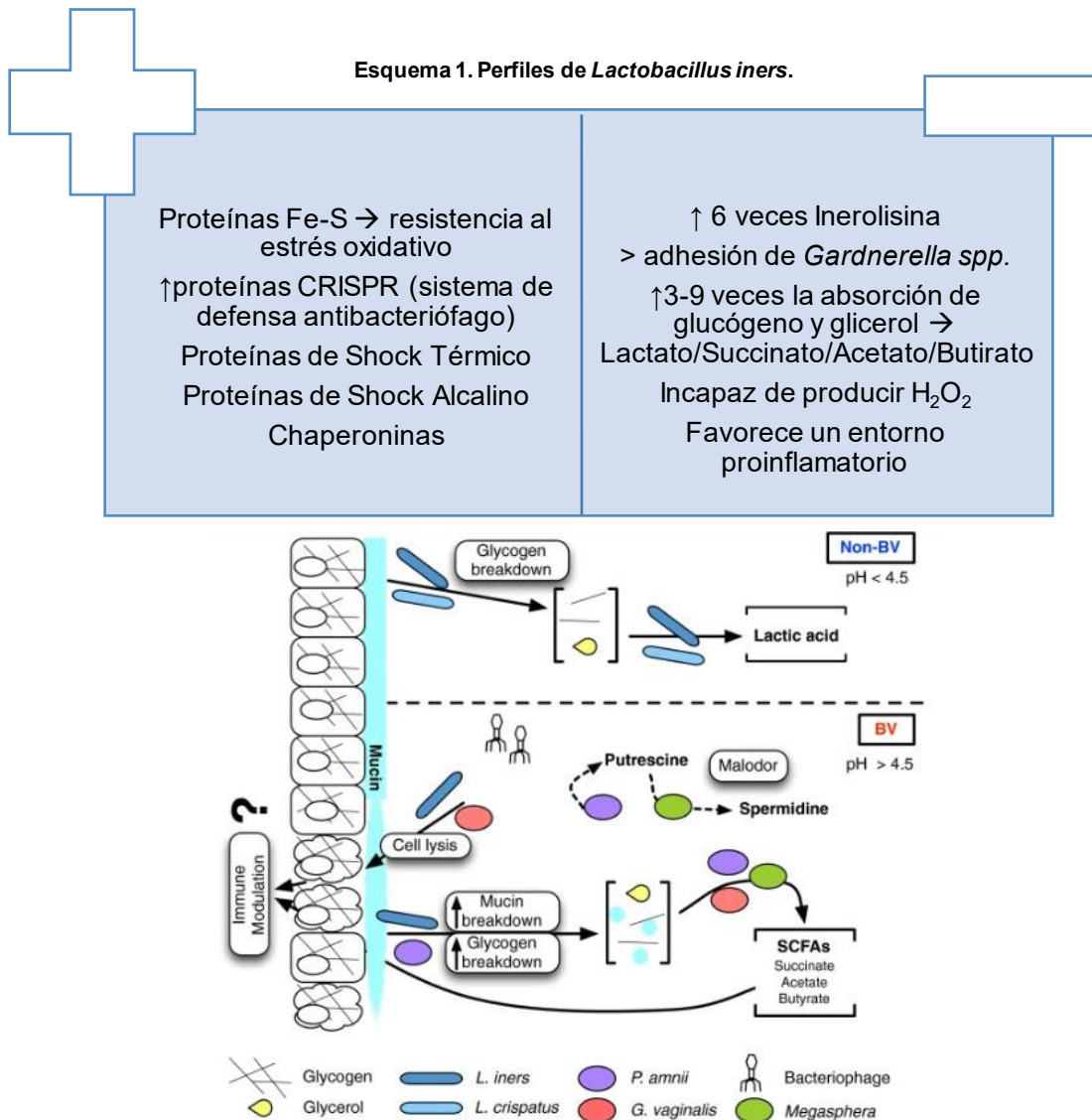
*L. iners* metaboliza glucosa y solo tiene LDH específica para producir L-lactato<sup>[156,157]</sup>. Esta isoforma, se ha correlacionado con un aumento significativo de los niveles del inductor de metaloproteinasa de matriz extracelular vaginal (EMMPRIN) y metaloproteinasa de matriz-8 (MMP-8), que alteran las uniones estrechas en el epitelio endocervical, lo que hace que el TGI sea susceptible a la infección por VPH<sup>[157]</sup>, *C. trachomatis*<sup>[46,158-165]</sup>, *Candida albicans*<sup>[163,165]</sup>.

Por el contrario, las altas concentraciones de D-lactato producido *L. crispatus*, aumentan la viscosidad del moco cervicovaginal y mejoran la captura de partículas virales<sup>[166]</sup>, inhibiendo el desarrollo de *Candida spp*<sup>[163,165]</sup>.

La presencia de *L. iners* en CST III y CST IV se asoció con una elevada liberación de factores proinflamatorios como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), interleucina-1 $\alpha$ , interleucina-18 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>[167]</sup>. Por otro lado, las células epiteliales exhiben un menor nivel de

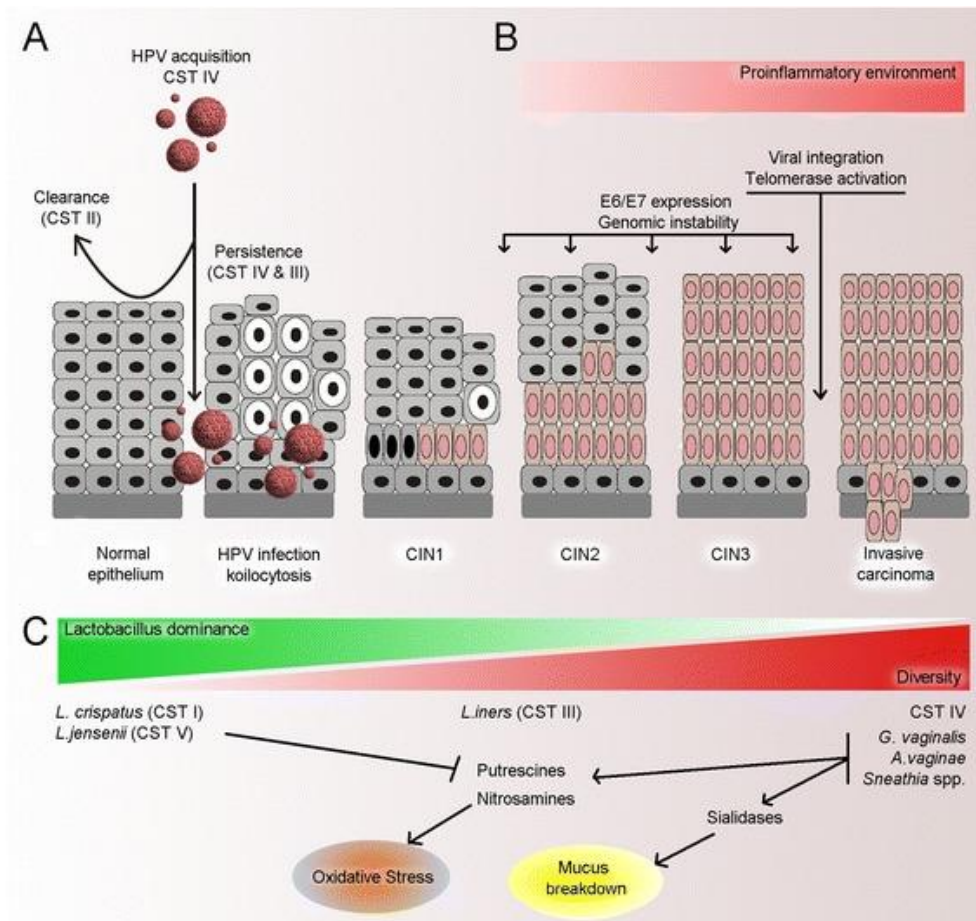
autofagia, una mayor inducción de proteínas de shock térmico relacionadas con el estrés<sup>[168]</sup>. Esto podría conducir a un estado de inflamación crónica; un factor bien conocido de carcinogénesis<sup>[169]</sup>.

Si bien algunas microbiotas dominadas por *L. iners* exhiben cierta estabilidad temporal, en general forma parte de microambientes con una mayor tendencia a estados deficientes en *Lactobacillus*<sup>[170,171]</sup>. La notable adaptación de *L. iners* al nicho vaginal podría deberse a su capacidad para regular sus funciones genómicas (variación del 10% del genoma en eubiosis versus DV). Queda por dilucidar en qué medida esto representa patogenicidad o una fuerte capacidad de colonización, especialmente porque varios factores presentes durante la VB pueden ser tóxicos o inhibidores para otros *Lactobacillus*, pero no para *L. iners*<sup>[155,156]</sup>.



**Figura 21. Funciones diferenciales de *Lactobacillus iners*.** Extraído de Macklaim, J.M., et al. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome* 1, 12 (2013).

En contraposición, *L. crispatus* no induce inflamación, y se ha asociado con la protección frente a patógenos<sup>[129,172]</sup>, menor probabilidad de infección por VPH-AR, y un mayor clearance viral<sup>[173]</sup> (Ver Figura 22).



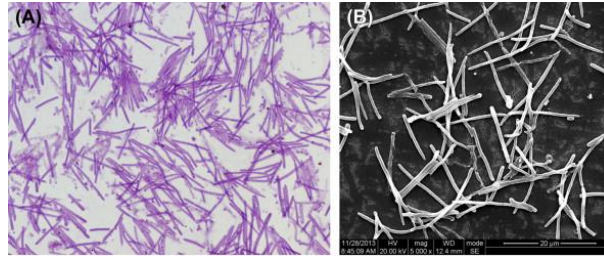
**Figura 22: La estructura de MV parece estar asociada con la adquisición y persistencia de la infección por VPH.** Extraído de Mitra A, et al. *The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next?* *Microbiome*. 2016 Nov 1;4(1):58.

Aún no se identificó con exactitud los roles de *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus jensenii*<sup>[174]</sup>. Sin embargo, la mayor estabilidad de los CST donde ejercen dominancia, los asocia a una rápida eliminación de VPH<sup>[169]</sup>.

Por último, se han descrito dos condiciones clínicas asociadas a un aumento significativo de *Lactobacillus*, que presentan leves diferencias entre sí.

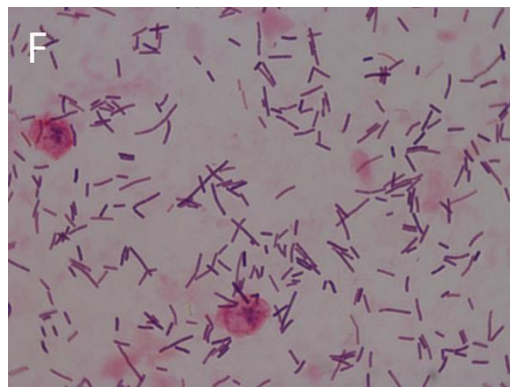
La lactobacilosis, condición informada en 1994 por Horowitz y colegas, caracterizada por flujo y prurito vulvovaginal cíclicos, predominantemente los 7-10 días previos a la menstruación<sup>[24]</sup>. Presenta una prevalencia del 5,51%<sup>[149]</sup>. El pH es menor a 4 y la prueba de aminas negativa. El diagnóstico es microscópico al

observar largos y serpenteantes elementos bacilares, de 40-75  $\mu\text{m}$ , en contraposición con los lactobacilos de longitud habitual (5-15  $\mu\text{m}$ ), llamados *Leptotrichia*<sup>[175-177]</sup> (Ver Figura 23). El motivo de esta elongación de los lactobacilos es desconocido. La morfología celular es normal y no hay respuesta inflamatoria<sup>[24]</sup>.



**Figura 23: (A) *Leptotrichia* (Tinción de Gram)-(B) *Leptotrichia* (MEB).** Adaptado de Xuedong, Z. *Supragingival Microbes. Atlas of Oral Microbiology*, (2015), 41-65.

Por otro lado, la vaginosis citolítica o *citólisis de Döderlein*, descrita por Cibley y Cibley en 1982, se presenta frecuentemente en mujeres en edad reproductiva, debido al sobrecrecimiento desmedido de los lactobacilos, principalmente *L. crispatus*<sup>[178]</sup>. Esto ocasiona un aumento de lactato, con disminución del pH vaginal y la aparición del cuadro clínico, que se intensifica en la fase lútea y desaparece con la menstruación. En este caso, son llamativas la citólisis y la presencia de las denominadas *falsas clue cells* (resultado del gran número de lactobacilos adheridos a las células) (Ver Figura 24). La respuesta inflamatoria es negativa<sup>[24]</sup>.



**Figura 24: Abundantes Lactobacillus y células epiteliales fragmentadas (núcleos desnudos y restos citoplasmáticos).** Adaptado de Kraut R, et al. *Scoping review of cytolytic vaginosis literature. PLoS ONE* (2023) 18(1): e0280954.

## Asociación entre Disbiosis e Infección por VPH

Investigaciones previas sobre el microbioma gastrointestinal han demostrado que los microorganismos comensales podrían promover o inhibir la carcinogénesis<sup>[179,180]</sup>.

Estudios más recientes han identificado vínculos potenciales entre el microbioma vaginal y el CCU: la MV podría influir en la regulación inmune y la oncogénesis, sin embargo, la inferencia causal sigue siendo incierta<sup>[181]</sup>.

Lee y sus colegas fueron los primeros en utilizar secuenciación de ADN de alto rendimiento (NGS) para examinar el impacto de la infección por VPH en la composición de la MV en una cohorte de gemelos coreanos, VPH discordantes. El objetivo de este estudio fue medir la contribución de la genética en comparación con los factores medioambientales. Las mujeres VPH positivas presentaron una mayor diversidad de especies y, significativamente menor presencia de *Lactobacillus spp.*, en comparación con su gemela no infectada. Además, se identificó a *Sneathia spp.* como un marcador microbiológico de infección por VPH<sup>[182]</sup>.

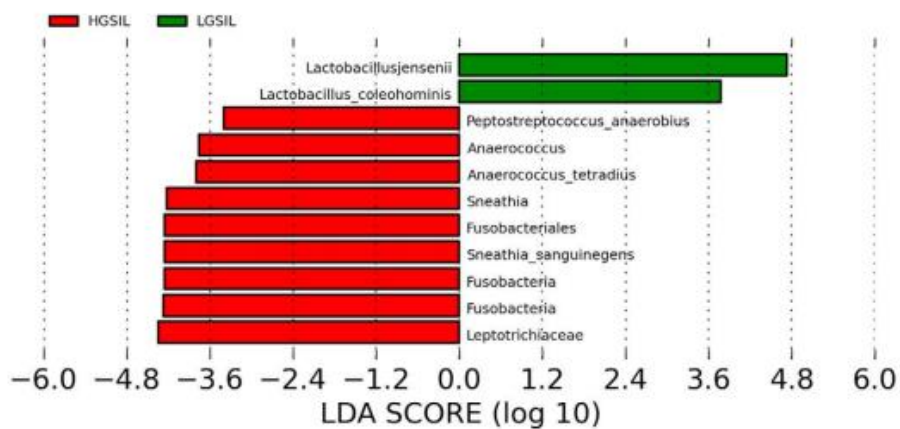
Recientemente se han realizado múltiples investigaciones adicionales con el fin de caracterizar el microbioma vaginal en mujeres con lesiones cervicales.

El primero de ellos, llevado a cabo en Reino Unido en 2015 por el equipo de Mitra, mostró que el aumento de la gravedad de la LIE está asociada con una mayor diversidad microbiana y con una disminución de la abundancia relativa de *Lactobacillus spp.*, independientemente del estado de VPH<sup>[183]</sup>.

Asimismo, se observó un aumento gradual en la prevalencia de CST IV (Ver *Tabla 6*), con el incremento en la severidad de la patología. La MV en HSIL se caracterizó por niveles más altos de *Sneathia sanguinegens* ( $P < 0,01$ ), *Anaerococcus tetradius* ( $P < 0,05$ ), *Peptostreptococcus anaerobius* ( $P < 0,05$ ); y niveles más bajos de *Lactobacillus jensenii* ( $P < 0,01$ ) en comparación con LSIL (Ver *Figura 25*), por lo que estos microorganismos podrían considerarse biomarcadores de severidad<sup>[183]</sup>.

<b>TABLA 6. TASAS DE CST SEGÚN LA SEVERIDAD DE ENFERMEDAD</b>						
<i>(Adaptado de Mitra A, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. Sci Rep 2015;5:16865)</i>						
	<b>CST I</b> <i>L. crispatus</i> n/N (%)	<b>CST II</b> <i>L. gasseri</i> n/N (%)	<b>CST III</b> <i>L. iners</i> n/N (%)	<b>CST IV</b> Polimicrob. n/N (%)	<b>CST V</b> <i>L. jensenii</i> n/N (%)	Total n/N (%)
<b>SEVERIDAD DE ENFERMEDAD</b>						
Normal	10/20 (50)	0/20 (0)	8/20 (40)	2/20 (10)	0/20 (0)	20/20 (100)
LSIL	22/52 (42)	1/52 (2)	12/52 (23)	11/52 (21)	6/52 (12)	52/52 (100)
HSIL	37/92 (40)	3/92 (3)	27/92 (29)	25/92 (27)	0/92 (0)	92/92 (100)
CCU	1/5 (20)	1/5 (20)	0/5 (0)	2/5 (40)	1/5 (20)	5/5 (100)
<b>Total</b>	<b>70/169 (41)</b>	<b>5/169 (3)</b>	<b>47/169 (28)</b>	<b>40/169 (24)</b>	<b>7/169 (4)</b>	<b>169/169 (100)</b>
Valor P <sup>1</sup>	0.30	0.12	0.38	0.06	0.47	-
Valor Q <sup>1</sup>	0.47	0.46	0.47	0.32	0.47	-

<sup>1</sup>Calculados mediante regresión lineal.

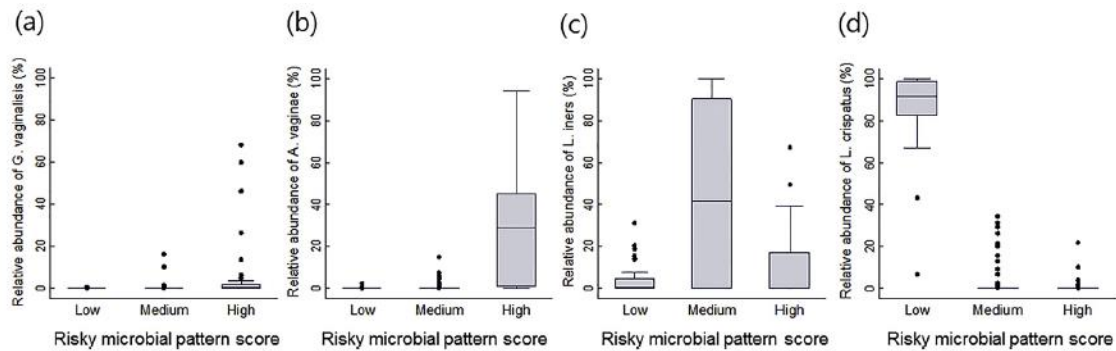


**Figura 25: Histograma de las puntuaciones LDA calculadas para características diferencialmente abundantes entre los estados patológicos LSIL y HSIL. Extraído de Mitra A, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. Sci Rep 2015;5:16865.**

Otro estudio de cohortes publicado posteriormente por Oh et al., incluyó mujeres coreanas con LSIL o HSIL en citología, versus controles normales (definidos como citología normal o ASC-US); y buscó evaluar su asociación con DV, utilizando *pirosecuenciación* (secuenciación mediante luminiscencia).

Los resultados sugirieron que patrones determinados por la escasez de *L. crispatus* y predominio de *A. vaginae*, *Gardnerella spp.*, y *L. iners*, se asociaron con un aumento de casi 6 veces en el riesgo de enfermedad cervical LSIL/HSIL, y por lo tanto los autores definieron esto como un "patrón de riesgo microbiano" (Ver Figura 26). La abundancia de *A. vaginae* se asoció a un mayor riesgo de LIE, presentando una diferencia estadísticamente significativa respecto de los controles. Adicionalmente, se observó un efecto sinérgico entre una puntuación alta de este

patrón microbiano y la infección por VPH-AR<sup>[184]</sup>. Si bien no hubo ajuste por factores de riesgo y se incluyeron mujeres con lesiones de significado indeterminado, el estudio destaca las probables cualidades protectoras de ciertas especies de *Lactobacillus* y el potencial patológico de otras asociadas a CST IV<sup>[3]</sup>.



**Figura 26:** La distribución de cuatro especies (*G. vaginalis*, *A. vaginae*, *L. iners* y *L. crispatus*). Los diagramas de caja muestran una diferencia significativa en la abundancia relativa de cada especie entre los terciles de la puntuación del patrón de riesgo; (a)  $P < 0,001$ , (b)  $P < 0,001$ , (c)  $P = 0,0361$ , (d)  $P < 0,001$  en la prueba de rangos de Kruskal-Wallis. Extraído de Oh HY, et al. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin Microbiol Infect* 2015;21(7):674.e1-9.

Kwasniewski et al. determinaron, mediante tipificación del ARNr 16S por PCR, que el CST de pacientes sanas (VPH negativas) estaba dominado por *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus taiwanensis*; sin embargo, *Gardnerella spp.* y *Lactobacillus acidophilus* estaban ausentes<sup>[185]</sup>.

En el CST de pacientes con LSIL (VPH positivas) predominaron *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus iners*; y, en pacientes con HSIL (VPH positivas) se encontró abundante *Gardnerella spp.* y *Lactobacillus acidophilus*, careciendo de las otras especies<sup>[185]</sup> (Ver Tabla 7 y Figura 27).

Los resultados de este estudio indicaron que el desarrollo de CCU inducido por VPH se asocia con una alta diversidad microbiana, que participaría en la persistencia de la infección y, por tanto, es indicativo del pronóstico de la enfermedad<sup>[185]</sup>.

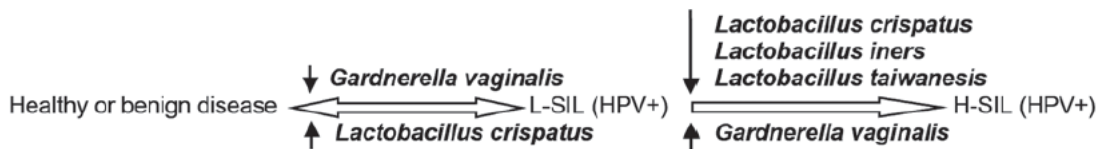
**TABLA 7. ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE ESPECIES BACTERIANAS SELECCIONADAS EN CONTROLES, Y PACIENTES DIAGNOSTICADAS CON LSIL Y HSIL.**

FRECUENCIAS >10 HAN SIDO RESALTADAS.

(Adaptado de Kwasniewski W, et al. Microbiota dysbiosis is associated with HPV-induced cervical carcinogenesis. *Oncol Lett* 2018;16(6):7035-47)

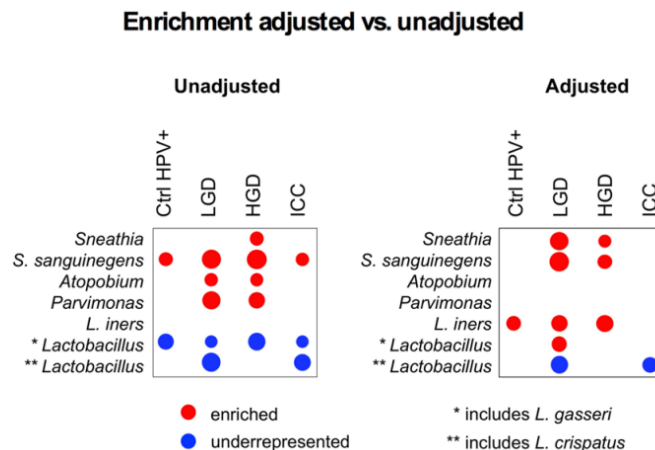
Especies	Control	LSIL	HSIL
<i>Actinomyces turicensis</i>	0	0.63	0
<i>Corynebacterium glaucum</i>	0.08	0	0.19

<i>Corynebacterium matruchotti</i>	0	0.07	0.19
<i>Gardnerella vaginalis</i>	11.47	46.93	304.49
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	20.87	1273.62	1193.89
<i>Lactobacillus crispatus</i>	2506.01	405.03	245.87
<i>Lactobacillus iners</i>	3772.35	3183.67	1217.21
<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	320.69	410.57	116.49
<i>Propionibacterium acnes</i>	0.88	0.42	0.48
<i>Propionibacterium humerusii</i>	0.16	0.13	0.14



**Figura 27: Modelo propuesto para el análisis de la asociación entre ocurrencia de especies bacterianas y diagnóstico histopatológico.** Extraído de Kwasniewski W, et al. Microbiota dysbiosis is associated with HPV-induced cervical carcinogenesis. *Oncol Lett* 2018;16(6):7035-47.

Laniewski et al. también demostraron que la dominancia de *Lactobacillus* disminuyó con la gravedad de la neoplasia cervical, lo que se correlacionó con un pH vaginal elevado en mujeres hispánicas. Además, *Sneathia* se enriqueció en todas las LIE<sup>[186]</sup> (Ver Figura 28). Sin embargo, la naturaleza transversal de estos datos no permitió la exploración del impacto que esa composición microbiana puede tener sobre el resultado clínico de las LIE y el clearance viral.

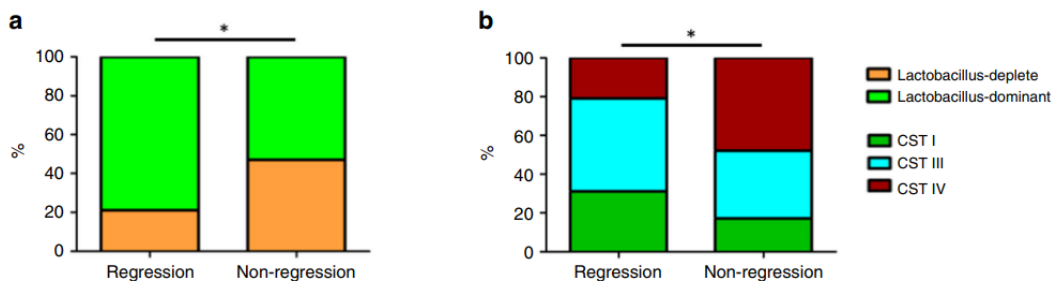


**Figura 28: Lactobacillus está subrepresentado, mientras que Sneathia está enriquecido en controles VPH positivo, LGD (LSIL), HGD (HSIL) y CCU en comparación con controles negativos para el VPH.** Extraído de Laniewski P, et al. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women. *Sci Rep* 2018;8(1):7593.

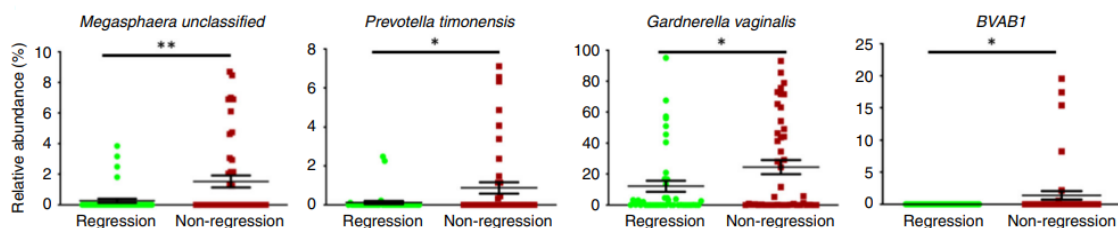
En un estudio previo de Brotman et al., un muestreo en serie de mujeres en el transcurso de 16 semanas sugirió que *Lactobacillus gasseri* puede promover la

eliminación de la infección aguda por VPH (P=0,03). En cambio, una MV con bajas proporciones de *Lactobacillus* y sobrepoblación de *Atopobium* (CST IV-B) presentó una tasa más lenta de clearance viral<sup>[187]</sup>. Aunque limitado por el poder estadístico, el estudio destacó la utilidad potencial de los perfiles longitudinales para examinar las relaciones temporales entre MV y la infección por VPH<sup>[5]</sup>.

Un análisis prospectivo de Mitra et al. examinó las relaciones temporales entre la MV y la historia natural de CIN2. Observaron que mujeres con dominio de *Lactobacillus* al inicio, tienen el doble de probabilidad de regresión a los 12 meses, en comparación con aquellas que tienen una MV pobre en estas especies (P=0,012). En tal dirección, CST IV se asoció significativamente con no-regresión en comparación con CST I (P=0,035) (Ver Figura 29). La presencia de taxones anaeróbicos específicos, incluidos *Megasphaera* (P=0,003), *Prevotella timonensis* (P=0,015) y *Gardnerella spp.* (P=0,036) se asociaron con la persistencia de CIN2 y una regresión más lenta (Ver Figura 30). Estos resultados sugieren que la composición de la MV en el momento del diagnóstico de CIN2, puede influir en la evolución natural de esta LIE. Esta investigación no encontró ninguna asociación particular entre clearance viral y MV<sup>[5]</sup>.



**Figura 29: Resultados a los 12 meses de seguimiento según la composición inicial de la MV al inicio del estudio. MV con depleción de *Lactobacillus* (a) y CST IV (b) se asociaron con tasas significativamente más bajas de regresión en comparación con la no regresión a los 12 meses. Adaptado de Mitra A, et al. *The vaginal microbiota associates with the regression of untreated cervical intraepithelial neoplasia 2 lesions*. *Nat Commun* 2020;11(1):1999.**



**Figura 30: Se observó una riqueza de especies significativamente mayor (especies observadas) en mujeres que no habían logrado el clearance viral a los 12 meses de seguimiento (P=0,0091). Adaptado de Mitra A, et al. *The vaginal microbiota associates with the regression of untreated cervical intraepithelial neoplasia 2 lesions*. *Nat Commun* 2020;11(1):1999.**

Investigaciones recientes respaldan el concepto de que las CST III y IV están frecuentemente relacionadas con la infección por VPH y el desarrollo de LIE. CST IV está asociado con mayores niveles de producción de aminas, las cuales no sólo son responsables de la característica secreción maloliente, sino que también resultan en la producción de nitrosaminas, con potencial carcinógeno. Se ha demostrado que *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* tienen capacidad de neutralizarlas in vivo<sup>[188]</sup>.

Además, *L. iners* se ha implicado en el agotamiento de la glutatión reductasa, a diferencia de *L. crispatus* y *L. jensenii*, que estarían relacionados con niveles elevados de esta enzima, indicando que la colonización por *L. iners* resulta en tasas más altas de estrés oxidativo<sup>[189]</sup>, conduciendo a la integración del VPH<sup>[190]</sup>.

En tal sentido, Kyrgiou y Mitra realizaron en el año 2017 una revisión acerca de la asociación entre CST y la historia natural de infección por VPH (Ver Figura 31), observando que CST I y una abundancia relativa de *L. crispatus* pueden resultar protectores.

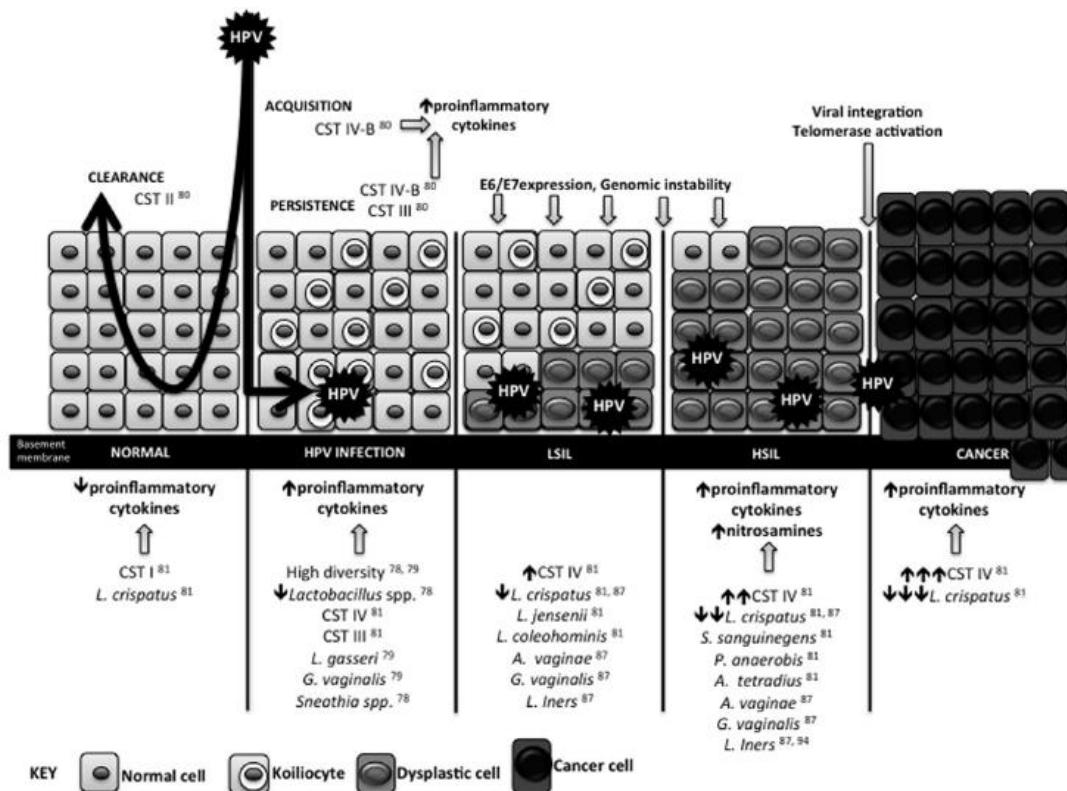


Figura 31. Historia natural de la infección por VPH y CST. Extraído de Kyrgiou M, et al. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? Transl Res. 2017 Jan;179:168-182.

La eliminación de las infecciones por VPH-AR se asocia con un nivel óptimo de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) producido por las células T helper 1 (Th1), que potencia la actividad citotóxica de las células T CD8+ citotóxicas<sup>[191]</sup>. Por el contrario, se ha demostrado que la interleuquina-17 (IL-17) suprime los efectores inmunes en enfermedades asociadas al VPH<sup>[192]</sup>; y, el papel de Th17 e IL-17 parece ser crucial en la progresión de la carcinogénesis cervical<sup>[193]</sup>.

Una investigación experimental realizada en Italia en 2021 demostró que todas las bacterias vaginales inducen la producción de IFN- $\gamma$ , siendo *L. gasseri* su mejor inductor. Las diferencias entre los *Lactobacillus* y las especies asociadas a DV, residen principalmente en la capacidad de estas últimas para estimular la diferenciación de Th17 y la producción de IL-17 al mismo tiempo.

*Gardnerella spp.* induce mayores cantidades de IL-17 en comparación con los *Lactobacillus*, lo que sugiere que los efectos combinados de niveles más bajos de IFN- $\gamma$  y una mayor concentración de IL-17 no apoyan adecuadamente una respuesta antiviral específica.

Por su parte, *L. iners* fue un estímulo óptimo para la producción de ambas citoquinas, corroborando su perfil ambivalente<sup>[194]</sup>.

Finalmente, un grupo de investigadores de la Universidad de Columbia de Estados Unidos ha realizado una revisión que expone los hallazgos principales <sup>[195]</sup> (Ver *Tabla 8*). Los mismos se listan a continuación:

- Los microbiomas ricos en *L. crispatus* se asocian con pacientes sanas<sup>[184,196,197]</sup>.
- Las mujeres VPH positivas presentan mayor diversidad microbiana, específicamente abundante en *L. gasseri* y *Gardnerella spp*<sup>[198]</sup>.
- *Lactobacillus iners*, por otro lado, se asoció con CCU solo<sup>[196]</sup>, o junto a infección por VPH<sup>[184]</sup>; así como también con LIE de alto grado en pacientes VPH positivas<sup>[199]</sup>.
- Varios conjuntos de especies bacterianas asociadas a VB, se han vinculado con LIE, incluyendo *Atopobium vaginae*<sup>[173,196]</sup>, *Gardnerella spp.*<sup>[173]</sup>, *Fusobacterium*<sup>[197]</sup>, *Sneathia*<sup>[197]</sup> y otras.

- Microbiomas con mayores cantidades de *L. gasseri* o *L. iners* se asociaron con una rápida remisión del VPH, mientras que microbiomas con bajas tasas de *Lactobacillus* y altas cantidades de *Atopobium* se asociaron con un clearance viral más lento<sup>[187]</sup>.
- Es interesante observar que, aunque *L. gasseri* se correlacionó positivamente con un mayor nivel de infección por VPH<sup>[198]</sup>, también se asoció con una mayor tasa de remisión<sup>[187]</sup>.
- Los *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* podrían ejercer un efecto protector. Una mayor abundancia de *Proteobacteria* vaginal permite estabilizar la microbiota<sup>[200]</sup>.

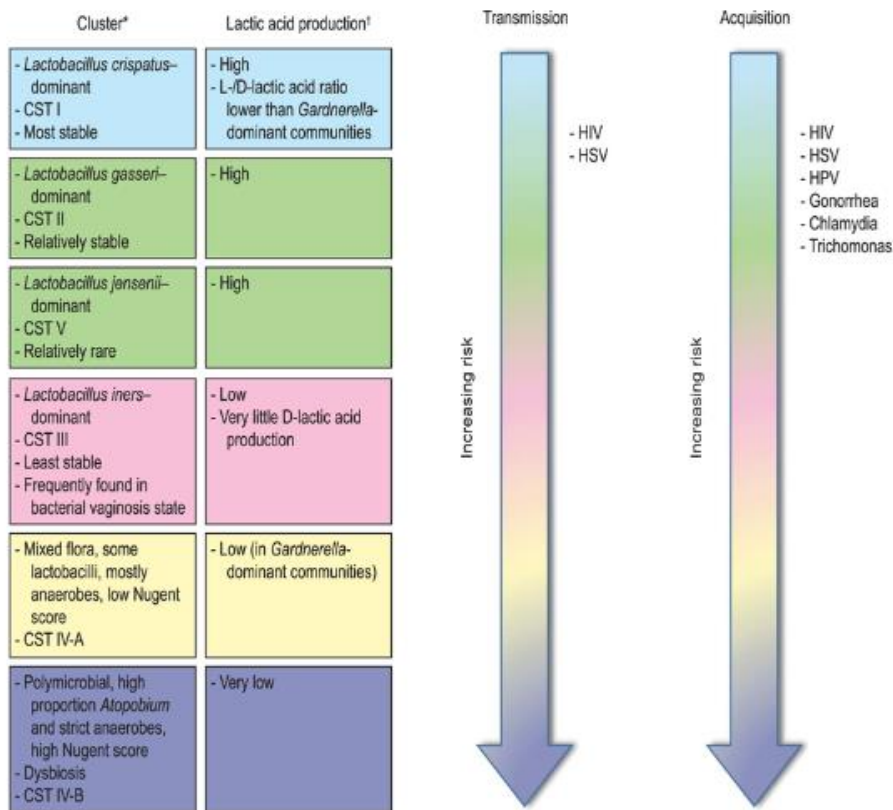
**TABLA 8. ASOCIACIÓN ENTRE ESPECIES ESPECÍFICAS DE LA MV Y LA PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD CERVICAL**

(Adaptado de Champer M, Wong AM, Champer J, Brito IL, Messer PW, Hou JY, et al. The role of the vaginal microbiome in gynaecological cancer. BJOG 2018;125(3):309-15)

Bacteria	Asociación con VPH	Asociación con clearance viral	Asociación con LIE
<i>Lactobacillus iners</i>	NO	SI	SI
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SI	SI	NO
<i>Gardnerella spp.</i>	SI	NO	SI
<i>Atopobium vaginae</i>	SI	NO	SI
<i>Fusobacterium</i>	SI	NO	SI
<i>Sneathia</i>	SI	NO	SI

## Disbiosis Vaginal y Otras Infecciones de Transmisión Sexual

El riesgo de adquirir y transmitir una ITS aumenta con la diversidad creciente de la MV y es más bajo en las comunidades dominantes de *L. crispatus*<sup>[43]</sup> (Ver Figura 32).



**Figura 32. CST y riesgo de infecciones de transmisión sexual.** Extraído de Lewis, et al. *Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases. Obstet Gynecol.* 2017 Apr;129(4):643-654.

Entre las bacterias, los estudios epidemiológicos han relacionado la VB con un mayor riesgo de infección por *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*<sup>[201]</sup>. In vitro, por ejemplo, se ha probado que *Lactobacillus* inhibe el crecimiento de *N. gonorrhoeae* y otros patógenos bacterianos<sup>[202,203]</sup>.

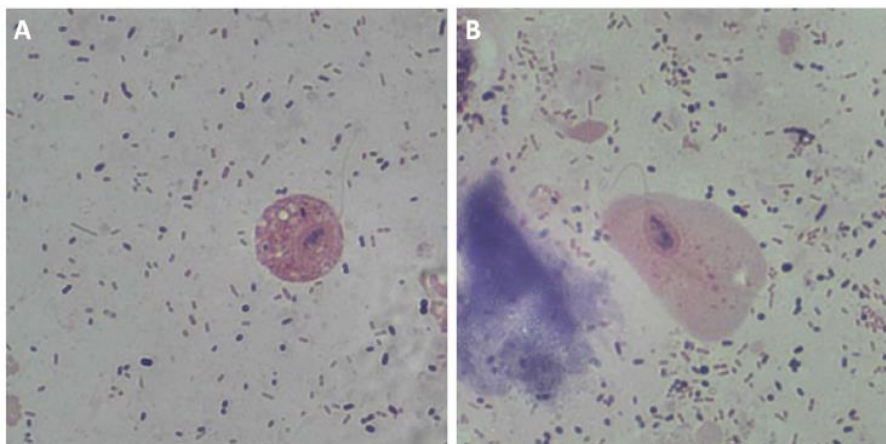
*Chlamydia trachomatis* es un patógeno intracelular obligado que puede participar en procesos oncogénicos, incrementando el riesgo de CCU; algunos estudios la asocian a la duplicación del genoma de la célula huésped por alteración y rotura del huso celular<sup>[204–207]</sup>. La presencia de ectopia cervical constituye un factor de riesgo para su adquisición<sup>[10]</sup>; y, como se mencionó previamente, el D- ácido

láctico es un inhibidor más potente de la infección por *C. trachomatis* que el L-lactato, el isómero asociado con una microbiota dominada por *L. iners*<sup>[46]</sup>.

*Mycoplasma genitalium*, otra ITS con una prevalencia estimada de 1-42%<sup>[24]</sup>, también se ha vinculado con un significativo incremento en la adquisición de VPH-AR. Un metanálisis que incluyó 22 estudios, demostró que *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum* se asociaron con un riesgo significativamente mayor de infección general por VPH; y, *U. urealyticum* y *Mycoplasma genitalium* se relacionaron con mayor riesgo de infección por VPH-AR. Además, *U. urealyticum*, *U. parvum* y *Mycoplasma hominis* constituyeron un factor de riesgo para citopatología cervical anormal<sup>[208]</sup>.

Cabe destacar que *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* son considerados oportunistas, pero pueden ocasionar infecciones en pacientes susceptibles. Estos microorganismos se recuperan con variada frecuencia en individuos sanos y no deberían ser considerados patógenos por su simple hallazgo. Sin embargo, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma parvum* se incluyen entre los patógenos más relevantes del tracto urogenital<sup>[24]</sup>.

La infección por *Trichomonas vaginalis* (Ver Figura 33) también se ha asociado estrechamente con la VB<sup>[202]</sup>. Se estima que es la enfermedad de transmisión sexual no viral curable más común en todo el mundo. Debido a esto, *T. vaginalis* se considera frecuentemente una ITS “desatendida”<sup>[130]</sup>. Si bien no es reportable, las estimaciones mundiales indican que, entre mujeres y hombres, hay 156 millones casos nuevos por año<sup>[209]</sup>.



**Figura 33. Tinción de Gram, 1000x. Trichomonas.** Adaptado de Vieira-Baptista P, et al. *International Society for the Study of Vulvovaginal Disease recommendations for the diagnosis and treatment of vaginitis.* 2023.

*T. vaginalis* se asocia muy frecuentemente con otras ITS y es un marcador de hábitos sexuales de alto riesgo<sup>[24]</sup>. Existe evidencia in vitro que muestra que la presencia de *T. vaginalis* disminuye los *Lactobacillus* ligados al epitelio, pero no las BAVB<sup>[210]</sup>. Además, se encontró que CST-IV estaba considerablemente relacionado con la detección de este parásito<sup>[128]</sup>. Favorece tanto la transmisión como la adquisición de VIH en la mujer, y su exitoso tratamiento puede reducir la excreción (*shedding*) genital del virus<sup>[211]</sup>. Genera un aumento de riesgo de 6,5 veces para la adquisición de VPH-AR<sup>[212]</sup>, y de neoplasia cervical<sup>[213]</sup>.

Con respecto al virus del herpes simple (VHS) y el riesgo de VB, se ha observado una relación bidireccional: el diagnóstico de VB se asocia con un mayor riesgo de seroconversión a VHS-2<sup>[214]</sup>; y la infección por VHS-2 se relaciona de manera dependiente con episodios de VB<sup>[215]</sup>.

Existe información sustancial que correlaciona la DV con un mayor riesgo de infección y transmisión de VIH-1. Un metaanálisis mostró que la VB se relacionó con un incremento del 60% en el riesgo de contraer VIH-1<sup>[216]</sup>. Un modelo de mucosa vaginal ha demostrado que *Lactobacillus*, predominantemente *L. crispatus*, reprimen la replicación del VIH-1<sup>[217]</sup>. Además, las mujeres VIH positivas con una MV dominada por *Lactobacillus spp.* tenían niveles cervicovaginales indetectables de VIH-1<sup>[218]</sup>. Por el contrario, *L. iners* se ha asociado con menor protección frente al VIH y menos beneficios inmunitarios<sup>[219]</sup>.

En general, el riesgo de adquirir VIH se duplicó en mujeres con infección persistente por VPH, con genotipos oncogénicos o no oncogénicos<sup>[220]</sup>. A su vez, la infección por HIV altera la evolución natural de la infección por VPH generando una mayor persistencia, que empeora con la magnitud de la inmunodeficiencia. Asimismo, el HIV compromete el epitelio mucoso, lo que facilita la penetración paracelular del VPH. Por último, se han detectado anomalías citológicas cervicales en el 38% de las mujeres HIV positivas, y en el 16% de mujeres HIV negativas; y las mujeres HIV positivas presentan un riesgo 4,5 veces mayor de desarrollar una LIE<sup>[7]</sup>.

## OBJETIVOS

### Objetivos Primarios

- Caracterizar la composición de la MV de pacientes con infección o enfermedad por VPH (casos), en comparación con un grupo control (con citología o test de VPH negativos), que concurren al Servicio de Ginecología del Hospital Provincial del Centenario en el período comprendido entre abril 2022-abril 2023.
- Evaluar la microbiota lactobacilar de cada grupo e identificarlos a nivel de especie.
- Determinar y describir la presencia de disbiosis vaginal en ambos grupos.

### Objetivos Secundarios

- Establecer diferencias en la composición de la MV según:
  1. Edad, menores y mayores de 30 años;
  2. Paridad;
  3. Status hormonal (edad fértil, postmenopausia);
  4. Fase del ciclo menstrual;
  5. Anticoncepción;
  6. Tiempo transcurrido desde la última relación sexual;
  7. Tabaquismo; y,
  8. Vacunación preventiva contra VPH.
- Estimar diferencias en pH vaginal y test de aminas en los diferentes grupos, y respecto de los estados vaginales básicos (BACOVA).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la revisión se realizó una búsqueda de la literatura científica utilizando PubMed/Medline con las siguientes palabras clave de búsqueda: “microbiota vaginal”, “microbioma vaginal”, “disbiosis vaginal”, “disbiosis vaginal y VPH”, “microbioma y VPH”, “disbiosis y cáncer cervical”.

Se incluyeron artículos y revisiones originales relevantes, indexados en PubMed/Medline y escritos en inglés. Las fechas de publicación no se limitaron para así poder revisar completamente la literatura disponible hasta mayo de 2023. Por otra parte, se recurrió a libros de texto actualizados de reconocidos investigadores de nuestro país, en materia de Virus del Papiloma Humano y Tracto Genital Inferior<sup>[7,10,24]</sup>.

Con respecto a la investigación de campo realizada en el Servicio de Ginecología del Hospital Provincial del Centenario, el diseño de la misma fue de casos y controles prospectivo, observacional, analítico y transversal. Vale aclarar que la utilización de la categoría “prospectivo” hace referencia a aquellos casos que fueron diagnosticados con posterioridad al inicio del estudio; mientras que la categoría “transversal” da noción sobre la forma de recolección de información.

Se examinaron 297 pacientes entre 15 y 69 años, con inicio de relaciones sexuales, que concurren a las Secciones de Ginecología General y Patología del Tracto Genital Inferior, en el período comprendido entre abril de 2022 y abril de 2023.

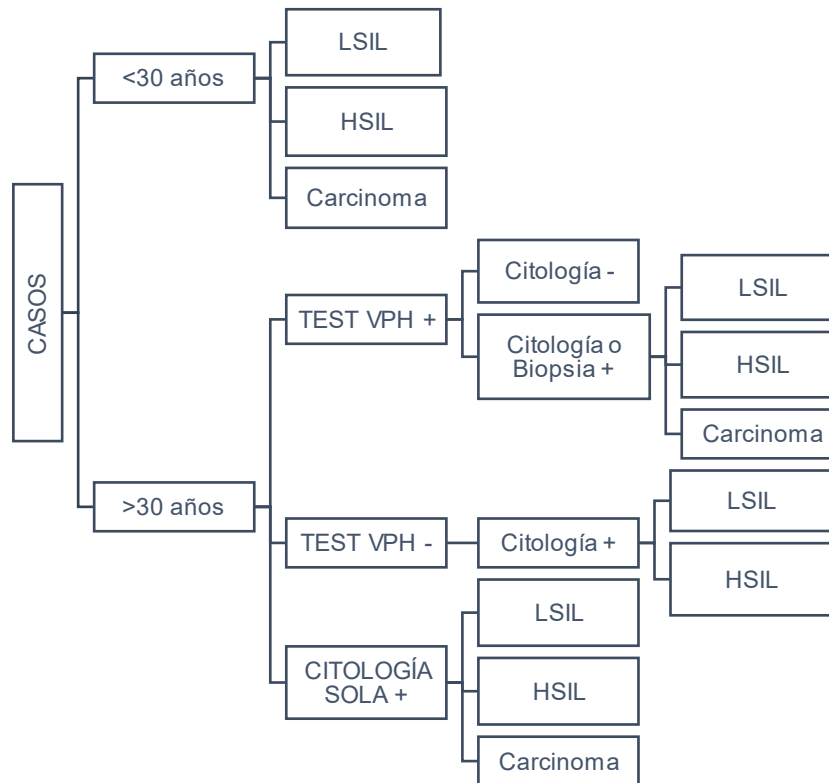
Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital (*Dictamen N° 1050*) y todas las pacientes brindaron su consentimiento informado oral y por escrito.

La población estudiada se clasificó de acuerdo a la división por edades para el screening de CCU<sup>[21]</sup>, y posteriormente se definieron los siguientes grupos (*Ver Esquemas 2 y 3*):

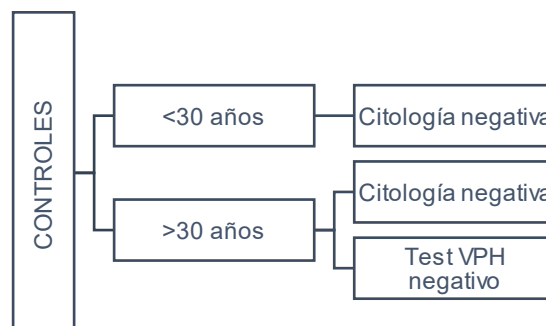
- **Casos:** pacientes con infección por VPH; o enfermedad, ya sea LSIL, HSIL o carcinoma cervical. Es decir, aquellas con test de VPH positivo solo, o asociado a LIE detectada por citología convencional o biopsia histológica.

- **Controles:** incluía a pacientes sin infección ni enfermedad por VPH, es decir, con test de VPH negativo o citología negativa (realizada dentro del último año calendario).

**Esquema 2. Definición de Casos.**



**Esquema 3. Definición de Controles.**



Los *criterios de exclusión* fueron: el uso de antibióticos locales o sistémicos dentro de los 15 días previos a la consulta, embarazadas, malformaciones genitales, pacientes inmunosuprimidas, sin inicio de relaciones sexuales, y citologías de significado indeterminado.

Durante la consulta, previa firma del consentimiento informado, se recabaron los datos para completar la historia clínica ginecológica. Se tomó muestra para citología cervical, exo y endocervical, a aquellas pacientes que no habían sido tamizadas dentro del último año. Se realizó test de VPH por captura híbrida, a todas las pacientes mayores de 30 años, cuando estuvieron disponibles (a partir de enero 2023); junto con la citología, y se analizaron en el laboratorio de Biología Molecular del Hospital Provincial de Rosario.

La metodología de evaluación de las citologías y piezas histológicas fue aquella recomendada por la Sociedad Argentina de Patología del Tracto Genital Inferior y Colposcopia (SAPTGLyC), junto a la Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Buenos Aires (SOGIBA), en su guía publicada en el año 2022<sup>[21]</sup>.

A todas las pacientes se les realizó toma de muestra de flujo de fondo de saco vaginal y endocérvix, para el estudio microbiológico, por metodología convencional y estudio de los EVB mediante BACOVA. El estudio microbiológico del contenido vaginal fue llevado a cabo en la Cátedra de Microbiología, Virología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, e incluyó los siguientes exámenes:

1. Determinación de pH de la secreción vaginal.
2. Observación en fresco y prueba de aminas.
3. Extendidos para coloración de Gram Nicolle.
4. Cultivo en agar base Columbia con 5% de sangre humana y en agar chocolate con incubación de 48 hs. a 37°C en atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>, conservando la muestra en medio de Stuart.

La detección de candidiasis se realizó a través de la observación en fresco y por cultivo en agar Sabouraud y agar sangre. La investigación de *T. vaginalis* se realizó a través de la observación microscópica directa con solución fisiológica.

Para el aislamiento de las distintas especies de *Lactobacillus* se utilizó agar sangre y el agar Man Rogosa (LSA agar) y la identificación se realizó mediante Espectrometría de Masa BDTM Bruker MALDI-TOF, utilizando una base de datos que incluyó más de 90 especies de *Lactobacillus*, considerando un score  $\geq 1,7$  para nivel de especie. Esto fue llevado a cabo en la Dirección de Bioquímica del Centro de Especialidades Médicas Ambulatorias de Rosario (C.E.M.A.R.).

Por último, se realizó investigación de microorganismos atípicos (*Mycoplasma hominis*, *M. genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*) por técnica de PCR. Tales muestras también fueron derivadas al C.E.M.A.R.

### Análisis Estadístico

Las variables continuas se resumen con la media y desvío estándar (DE), si cumplen el supuesto de normalidad; o con la mediana y los cuartiles 1 (Q1) y 3 (Q3), si no se cumple dicho supuesto. Las variables categóricas se resumieron en frecuencia y porcentaje.

Para analizar las variables según diferentes subgrupos de pacientes se utilizó, para las categóricas, el test Chi-cuadrado o test de Fisher; y, para las continuas el test t-Student si se cumplía el supuesto de normalidad, y el test de Wilcoxon en caso de que no se verifique dicho supuesto. Para analizar el supuesto de normalidad de las variables continuas se aplicó el test de Shapiro-Wilk. En todos los test el nivel de significación empleado fue 0.05.

Para evaluar el tamaño del efecto de las variables en estudio se calculó la razón de probabilidades (*Odds ratio*- OR).

Para el procesamiento de los datos se utilizó el software R.

## RESULTADOS

Se evaluaron 297 pacientes entre 15 y 69 años, con una edad media de 38 ± 4. El 75% (n=223) de las mismas presentó una edad mayor o igual a 30 años; y el 25% (n=74), una edad menor a 30 años.

Según los resultados del tamizaje para CCU, las pacientes fueron divididas en 83 *Casos* (28%) y 214 *Controles* (72%), que se subdividieron de la siguiente manera (*Ver Tabla 9*):

<30 AÑOS (N=74)		>30 AÑOS (N= 223)					
CONTROLES	CASOS (N= 17)		CONTROLES	CASOS (N=66)			
	PAP LSIL	PAP HSIL		PAP LSIL C/S TEST	PAP HSIL C/S TEST	PAP CA	TEST VPH+ SIN LESION
57 (77%)	4 (5,5%)	13 (17.5%)	157 (70%)	10 (5%)	42 (19%)	5 (2%)	9 (4%)

En las 223 pacientes mayores de 30 años, se empleó Papanicolaou convencional en 158 mujeres (71%), y Cotest en 65 de ellas (29%), según disponibilidad, siendo negativas en el 66% de los casos (n=43), y positivas en el 34% (12 VPH 16-18, y 10 para otros tipos VPH-AR).

En la siguiente tabla (*Ver Tabla 10*) se muestran las variables evaluadas en la población estudiada:

FACTOR	CASOS= 83 N (%)	CONTROLES= 214 N (%)
EDAD		
<30 años	17 (20.5%)	57 (27%)
≤19	1	4
20-29	16	53
>30 años	66 (79.5%)	157 (73%)
30-39	34	61
40-49	23	58
50-59	6	26
≥60	3	12
ESCOLARIDAD		

Ninguna	2 (2%)	3 (1%)
Primaria completa	30 (36%)	76 (36%)
Primaria incompleta	5 (6%)	21 (10%)
Secundaria completa	18 (22%)	59 (27%)
Secundaria incompleta	22 (27%)	43 (20%)
Terciario/ Universitario	6 (7%)	12 (6%)
<b>PARIDAD</b>		
Nulípara	12 (14%)	52 (24%)
Múltipara	71 (86%)	162 (76%)
<b>ESTADO HORMONAL</b>		
Edad Fértil	71 (86%)	174 (81%)
Fase Proliferativa	26	55
Fase Secretora	30	58
Ritmo Irregular	6	32
Amenorrea por MAC	9	29
Postmenopausia (PM)	12 (14%)	40 (19%)
<b>MÉTODO ANTICONCEPTIVO</b>		
ACO	27 (32%)	47 (22%)
ACI	8 (10%)	8 (4%)
Mesigyna	8	5
MPDA	0	3
Implante subdérmico	4 (5%)	12 (6%)
Desogestrel	4 (5%)	13 (6%)
Dispositivos Intrauterinos	4 (5%)	24 (11%)
DIU-Cu	3	17
SIU-LNG	1	7
Barrera	7 (8%)	23 (11%)
Anticoncepción quirúrgica	7 (8%)	22 (10%)
Ninguno	22 (12 PM) (27%)	65 (39 PM) (30%)
<b>TIEMPO DESDE ÚLTIMA RELACIÓN SEXUAL</b>		
<48 hs	12 (14%)	35 (16%)
>48 hs	71 (86%)	179 (84%)
<b>TIPO DE PAREJA</b>		
Heterosexual	83	213
Igualitaria	0	1
<b>TABAQUISMO</b>		
SI	29 (35%)	50 (23%)
NO	54 (65%)	164 (77%)
<b>VACUNA CONTRA VPH</b>		
Bivalente	4 (5%)	7 (3%)
Tetravalente	2 (2%)	8 (4%)
Ninguna	77 (93%)	199 (93%)

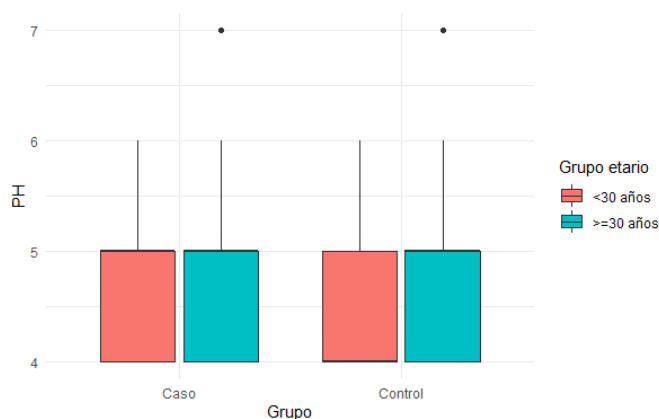
En el 50% de los *Casos* y 60% de los *Controles* se observó un nivel educacional alto. En ambos grupos, se detectó un predominio de mujeres multíparas, en edad fértil, que utilizaban en mayor medida métodos hormonales para anticoncepción. Resulta importante destacar el elevado porcentaje de mujeres premenopáusicas que no utiliza método anticonceptivo (12% en cada grupo). Respecto de la prevención primaria contra el VPH, el porcentaje de vacunación fue bajo, pero esto responde a que su incorporación en el Calendario Nacional a partir del año 2011, contempla solo al 7% de la población de este estudio.

Se realizó el análisis microscópico de las muestras de flujo vaginal por **BACOVA** (Estados Vaginales Básicos), obteniendo los siguientes resultados, sin encontrar asociación significativa con la presencia/ausencia de VPH (Ver *Tabla 11*). Tampoco hubo diferencias por edad ( $P=0,42$ ).

TABLA 11. ANÁLISIS BACOVA				
	Caso (N=83)	Control (N=214)	P-value	Overall (N=297)
<b>BACOVA</b>				
EVB 1	22 (26.5%)	65 (30.4%)	0.537	87 (29.3%)
EVB 2	21 (25.3%)	44 (20.6%)		65 (21.9%)
EVB 3	9 (10.8%)	37 (17.3%)		46 (15.5%)
EVB 4	13 (15.7%)	30 (14.0%)		43 (14.5%)
EVB 5	18 (21.7%)	38 (17.8%)		56 (18.9%)

El **valor de pH** no presentó diferencias significativas en los grupos, con una sutil tendencia hacia la alcalinidad en los *Casos* (pH 4.83), al compararlos con los *Controles* (pH 4.58) (Ver *Figura 34*). Tampoco se encontró asociación significativa con el status hormonal ( $P=0,157$ ).

Figura 34. Medición de pH en Casos y Controles



Respecto del **test de aminas** se observó que está asociado al EVB ( $P=0,0001$ ); y, de hecho, la positividad del mismo se vio duplicada (2.2 veces) en todas las pacientes con EVB IV (Vaginosis Bacteriana), independientemente de la edad y de la presencia/ausencia de VPH ( $P<0,001$ ).

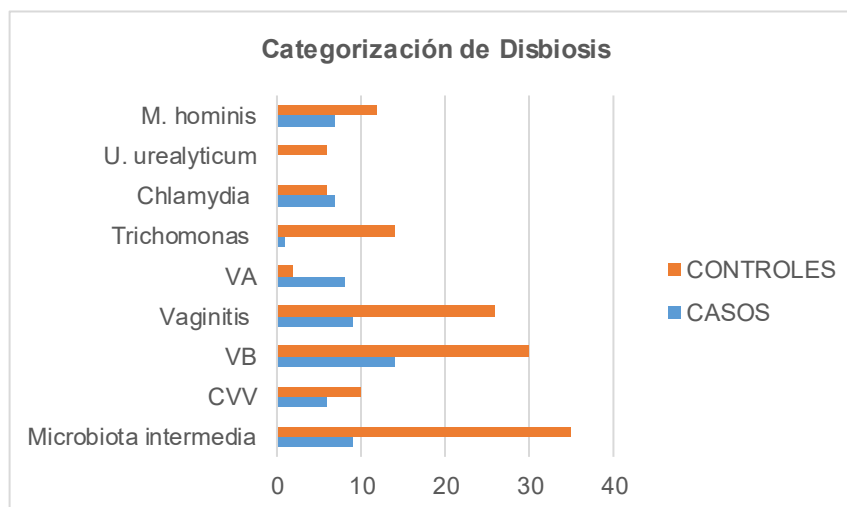
Se evaluó la presencia de **disbiosis** en cada grupo, considerada como EVB III a V (Microbiota Intermedia- Vaginosis Bacteriana- Vaginitis), o la presencia de ITS. La prevalencia global de DV fue de 54 por cada 100 pacientes, con un 56.6% en el grupo Casos, y 53.3% en los *Controles* (Ver Tabla 12).

<b>TABLA 12. PREVALENCIA DE DISBIOSIS VAGINAL</b>			
	<b>Casos (N=83)</b>	<b>Controles (N=214)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>DISBIOSIS</b>			
No	36 (43.4%)	99 (46.2%)	
Si	47 (56.6%)	115 (53.3%)	1.12 (0.67-1.87)

A continuación, se realizó la **categorización del estado de disbiosis** en función de los cultivos para gérmenes comunes y PCR para microorganismos atípicos (Ver Tabla 13 Y Figura 35).

<b>TABLA 13. CATEGORIZACIÓN DE PACIENTES CON DV</b>			
<b>DISBIOSIS Descripción</b>	<b>CASOS (N=83)</b>	<b>CONTROLES (N=214)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
<b>Microbiota intermedia</b>	9 (11%)	35 (16%)	0.62 (0.28-1.36)
<b>CVV</b>	6 (7%)	10 (0.5%)	1.59 (0.56-4.52)
<b>VB</b>	14 (17%)	30 (1.4%)	1.24 (0.62-2.49)
<b>Vaginitis</b>	9 (11%)	26 (12%)	2.05 (0.83-5-06)
<b>VA</b>	8 (10%)	2 (0.9%)	0.77 (0.33-1.78)
<b>Trichomonas</b>	1 (1%)	14 (6.5%)	.
<b>Chlamydia</b>	7 (8%)	6 (2.8%)	1.32 (0.51-3-39)
<b>U. urealyticum</b>	0 (0%)	6 (2.8%)	.
<b>M. hominis</b>	7 (8%)	12 (5.6%)	2.05 (0.83-5-06)
<b>TOTAL</b>	<b>47</b>	<b>115</b>	

Figura 35. Categorización de Casos y Controles con Disbiosis Vaginal



Se logró aislar **Lactobacillus** en el 36,4% de las pacientes: 33/83 del grupo Casos, y 75/214 de los Controles. De los 108 aislamientos, sólo sobrevivió el 71,3% ya que el resto fue descartado por contaminación con otros gérmenes o por falta de desarrollo debido a sus elevadas exigencias nutricionales.

Al realizar la caracterización de especies por MALDI-TOF MS, se obtuvieron los siguientes resultados (Ver Tabla 14):

**TABLA 14: CARACTERIZACIÓN DE LACTOBACILLUS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

ESPECIES LACTOBACILLUS	CASOS (N= 33/83)	CONTROLES (N= 75/214)	TOTAL (N= 108/297)
<b>ESPECIES</b>			
<i>L. crispatus</i>	10 (30%)	12 (16%)	22 (20%)
<i>L. gasseri</i>	2 (6%)	7 (9%)	9 (8%)
<i>L. iners</i>	2 (6%)	0 (0%)	2 (2%)
<i>L. jensenii</i>	4 (12%)	12 (16%)	16 (15%)
<i>L. acidophilus</i>	0 (0%)	2 (3%)	2 (2%)
<i>L. fermentum</i>	1 (3%)	1 (1.5%)	2 (2%)
<i>L. reuteri</i>	0 (0%)	2 (3%)	2 (2%)
<i>L. salivarius</i>	0(0%)	1 (1.5%)	1 (1%)
<i>Lactobacillus spp</i>	7 (21%)	14 (18%)	21 (19%)
Missing	7 (22%)	24 (32%)	31 (29%)

Se detectó una mayor prevalencia de *L. gasseri* y *L. jensenii* en los *Controles*, y de *L. iners* en los *Casos*, sin encontrar diferencias en la detección de *L. crispatus*.

En la *Tabla 15* se resumen todos los microorganismos aislados en medios de cultivo en cada grupo.

<b>TABLA 15. MICROORGANISMOS AISLADOS POR TÉCNICAS DE CULTIVO CONVENCIONALES Y PCR</b>					
Microorganismo	Casos		Controles		Total de pacientes (N=297)
	<30 años (N=17)	>=30 años (N=66)	<30 años (N=57)	>=30 años (N=157)	
<b>Aerobios y Facultativos</b>					
<b>Bacilos Gram Positivos</b>					
<i>Lactobacillus spp.</i>	6 (35.3%)	28 (42.4%)	27 (47.4%)	51 (32.5%)	112 (38%)
<i>Corynebacterium spp.</i>	0 (0%)	3 (4.55%)	3 (5.26%)	2 (1.27%)	8 (3%)
<i>Gardnerella spp.</i>	6 (35.3%)	16 (24.2%)	12 (21.1%)	27 (17.1%)	61 (21%)
<b>Cocos Gram Positivos</b>					
<i>S. coagulasa</i> negativos	0 (0%)	2 (3.03%)	2 (3.51%)	8 (5.10%)	12 (4%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2 (11.8%)	4 (6.06%)	2 (3.51%)	11 (7%)	19 (6.3%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (5.88%)	1 (1.52%)	4 (7.01%)	11 (7%)	17 (5.7%)
<i>Streptococcus spp.</i>	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.75%)	3 (1.91%)	4 (1.3%)
<b>Bacilos Gram Negativos</b>					
<i>Escherichia coli</i>	2 (11.8%)	9 (13.6%)	7 (12.3%)	35 (22.2%)	53 (18%)
<i>Escherichia coli BLEE</i>	0 (0%)	0 (0%)	4 (7.02%)	1 (0.63%)	5 (1.7%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (5.88%)	3 (4.55%)	2 (3.51%)	4 (2.54%)	10 (3.4%)
<i>K. pneumoniae BLEE</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.63%)	1 (0.3%)
<i>Klebsiella oxycota</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.63%)	1 (0.3%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0 (0%)	1 (1.52%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.3%)
<i>Proteus mirabilis</i>	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.75%)	2 (1.27%)	3 (1%)
BGN no fermentadores	1 (5.88%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.3%)
<b>Mollicutes</b>					
<i>M. hominis</i>	2 (11.8%)	8 (12.1%)	2 (3.51%)	7 (4.46%)	20 (6.7%)
<i>U. urealyticum</i>	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.75%)	5 (3.18%)	6 (2%)
<b>Levaduras</b>					
<i>Candida albicans</i>	3 (17.7%)	7 (10.6%)	5 (8.77%)	15 (9.55%)	30 (11%)
<i>Candida glabrata</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (2.54%)	4 (1.3%)
<i>Candida no albicans</i>	0 (0%)	1 (1.52%)	1 (1.75%)	4 (2.54%)	6 (2%)
<b>Anaerobios</b>					
<i>Morganella morganii</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1.27%)	2 (0.7%)
<i>Mobiluncus spp.</i>	1 (5.88%)	2 (3.03%)	2 (3.51%)	6 (3.82%)	11 (3.7%)
<b>Sin desarrollo</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (4.45%)	7 (2.4%)
<b>Infecciones de Transmisión Sexual</b>					
<i>M. genitalium</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>C. trachomatis</i>	3 (17.6%)	4 (6.06%)	10 (17.5%)	4 (2.54%)	21 (7%)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	0 (0%)	1 (1.52%)	1 (1.75%)	1 (0.63%)	3 (1%)

De las 297 pacientes evaluadas, los microorganismos más frecuentes fueron *Lactobacillus spp.* (38%), *Gardnerella spp.* (21%), *Escherichia coli* (18%) y, *Candida Albicans* (11%); sin presentar diferencias por edad ni status de VPH.

Por último, se evaluaron los **factores asociados a disbiosis vaginal (DV)**:

- **PARIDAD**: el riesgo de DV fue 1.78 veces mayor en las pacientes multíparas en comparación con las nulíparas. Esta asociación fue estadísticamente significativa al 90% (OR= 1.78 IC 90% 1.07-2.94).
- **STATUS HORMONAL**: el riesgo de DV fue 1.94 veces mayor en las pacientes que se encuentran en la fase proliferativa del ciclo menstrual (OR= 1.94 IC 95% 1.15-3.26); y, 3.89 veces mayor en pacientes postmenopáusicas, en comparación con aquellas en edad fértil (OR= 3.89 IC 95% 1.81-8.33).
- **MAC**: el riesgo de DV fue 2.99 veces mayor en las pacientes que utilizan DIU-Cu como método anticonceptivo (OR= 2.99 IC 95% 1.15-7.74).

Para el resto de las variables en estudio (edad- tabaquismo- tiempo transcurrido desde última relación sexual- vacunación contra VPH), no se hallaron asociaciones estadísticamente significativas.

## CONCLUSIÓN

La capacidad de establecer un vínculo causal entre la microbiota vaginal, la infección por VPH y el desarrollo de patología cervical, está limitada por la naturaleza transversal de la mayoría de los estudios realizados en esta área. Esta dificultad se profundiza aún más por la lenta historia natural de la enfermedad, con una evolución desde la infección aguda hasta la lesión intraepitelial de alto grado que lleva años a décadas.

Por este motivo, hasta el momento, sólo es posible demostrar asociación en lugar de causalidad. Este aspecto es reconocido como una de las limitaciones actuales de la investigación en curso sobre el *oncobioma*, es decir, la microbiota asociada al desarrollo de neoplasias. Además, muchos otros factores de confusión pueden afectar los resultados, como el uso de anticoncepción hormonal y las prácticas sexuales. Si bien se ha comprobado su asociación con la MV, la información recopilada es muy heterogénea y no hay estudios que examinen la interacción concomitante con la infección por VPH.

Por otro lado, gran parte de las investigaciones publicadas describen la MV en cohortes relativamente pequeñas con ausencia o limitada representación de un grupo considerable de pacientes normales, controles VPH negativos para las comparaciones descriptas.

En este estudio, no pudo demostrarse una significancia estadística entre disbiosis vaginal y status de VPH, probablemente debido a que el número de pacientes no fue suficiente para realizar cálculos de asociación válidos.

Respecto de la categorización del estado de disbiosis, la candidiasis vulvovaginal, la vaginosis bacteriana, vaginitis e infección por *Chlamydia*, mostraron una tendencia de riesgo para disbiosis, que requiere de mayor muestra para ampliar su valor estadístico. Resulta preciso destacar el elevado porcentaje de positividad de *Chlamydia* en el total de pacientes (7%), ya que duplica al informado por la OMS en el año 2020<sup>[221]</sup>.

En la identificación de *Lactobacillus* por especies, si bien se comprobó un predominio de *L. gasseri* y *L. jensenii* en pacientes sanas, y de *L. iners* en los Casos, el número de la muestra no fue significativo. Sería apropiado para un futuro,

la mejora de las técnicas de conservación y transporte, para asegurar la supervivencia de estos microorganismos tan exigentes.

El porcentaje de detección a nivel de especies por la técnica de MALDI-TOF en esta investigación fue del 73%. El resto fue categorizado sólo a nivel de género, por no encontrar picos en el tiempo de vuelo de los iones que permitan una identificación confiable; factor que podría haberse superado si el cultivo y la espectrometría de masas se hubiesen realizado en el mismo lugar físico.

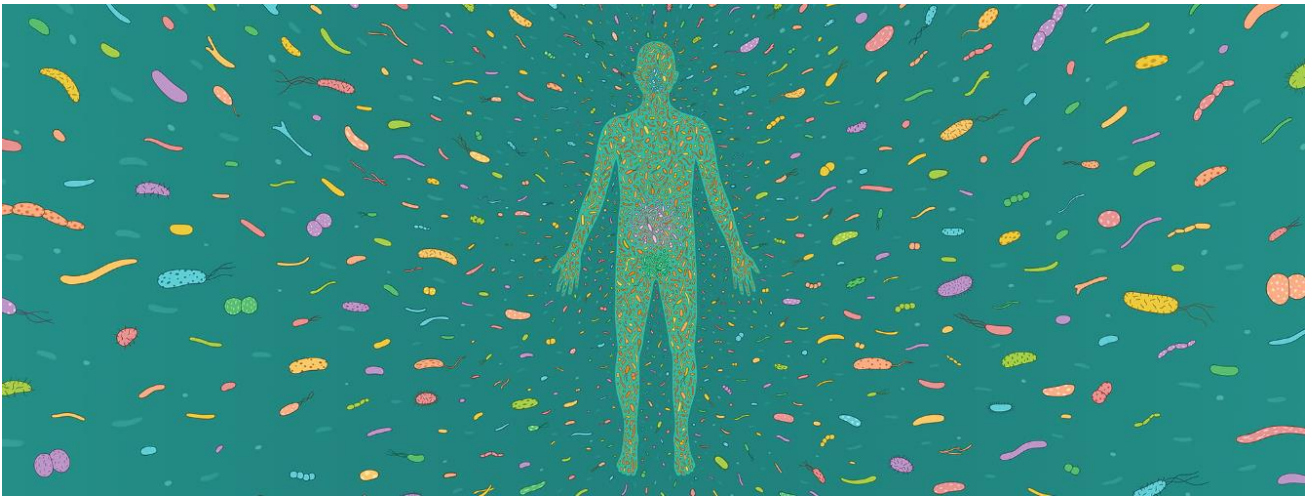
Pudo demostrarse que la multiparidad, la postmenopausia<sup>[63,64]</sup>, y el uso de DIU-Cu<sup>[78,222]</sup>, constituyen factores de riesgo para el desarrollo de disbiosis, en concordancia con lo expuesto previamente. En relación, el estudio publicado por Kervinen et al. demostró que la nuliparidad es un fuerte predictor de MV dominada por *Lactobacillus crispatus*<sup>[223]</sup>. Respecto del riesgo de DV asociado a la fase proliferativa del ciclo menstrual, eso se contrapone a la evidencia, por lo que se considera que podría haber factores confundentes asociados, como por ejemplo el uso de determinados MAC, o ciertas prácticas desfavorables.

En tal sentido, hubiese resultado enriquecedor ampliar esta investigación con un análisis cualitativo de la conducta sexual y de los hábitos de higiene y gestión menstrual.

Los hallazgos recientes sugieren que la composición de MV puede ser un biomarcador útil en el futuro como predictor de la persistencia o regresión del VPH. Asimismo, esto podría contribuir al desarrollo de dianas terapéuticas de modulación de la MV con pre o probióticos, para el tratamiento y/o la prevención.

Junto a la microbiota bacteriana, el *viroma* ahora es una nueva área emergente de interés: otros géneros virales presentes en la vagina normal, junto con *Papillomaviridae*, pueden estar involucrados en la progresión de la enfermedad. Además, existe una relación simbiótica entre bacterias y comunidades virales, lo que requiere investigación específica.

En conclusión, existe evidencia convincente de que los cambios en la microbiota vaginal afectan la historia natural de la infección por VPH, pudiendo constituir un nuevo cofactor. No obstante, quedan múltiples complejas interacciones por descifrar.



*Fuente: American Museum of Natural History.*

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lederberg J, McCray A. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 2001;7-8.
2. Barrientos-Durán A, Fuentes-López A, de Salazar A, Plaza-Díaz J, García F. Reviewing the composition of vaginal microbiota: Inclusion of nutrition and probiotic factors in the maintenance of eubiosis. *Nutrients* 2020;12(2).
3. Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki AB. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Translational Research* 2017;179:168-82.
4. Lebeau A, Bruyere D, Roncarati P, Peixoto P, Hervouet E, Cobraiville G, et al. HPV infection alters vaginal microbiome through down-regulating host mucosal innate peptides used by Lactobacilli as amino acid sources. *Nat Commun* 2022;13(1).
5. Mitra A, MacIntyre DA, Ntritsos G, Smith A, Tsilidis KK, Marchesi JR, et al. The vaginal microbiota associates with the regression of untreated cervical intraepithelial neoplasia 2 lesions. *Nat Commun* 2020;11(1):1999.
6. Alimena S, Davis J, Fichorova RN, Feldman S. The vaginal microbiome: A complex milieu affecting risk of human papillomavirus persistence and cervical cancer. *Curr Probl Cancer* 2022;46(4):100877 .
7. Tatti S, Fleider L. Enfoque integral de las Patologías relacionadas con el Virus del Papiloma Humano. En la era de la vacunación y el tamizaje virológico. Buenos Aires: 2017.
8. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3/52-61.
9. Organización Mundial de la Salud. Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC). 2020.
10. Tatti, Fleider. Enfermedades de la vulva, la vagina y la región anal: nuevos enfoques preventivos, diagnósticos y terapéuticos en la era de la vacunación. 1er Edición. Buenos Aires, Argentina: 2013.
11. Cascardi E, Cazzato G, Daniele A, Silvestris E, Cormio G, Di Vagno G, et al. Association between Cervical Microbiota and HPV: Could This Be the Key to Complete Cervical Cancer Eradication? *Biology (Basel)* 2022;11(8):1114.
12. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon (FR): 2007.
13. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110(3 Suppl 2):S4-7.
14. 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.
15. Darragh TM, Colgan TJ, Thomas Cox J, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol* 2013;32(1):76-115.
16. Burger EA, Kim JJ, Sy S, Castle PE. Age of Acquiring Causal Human Papillomavirus (HPV) Infections: Leveraging Simulation Models to Explore the Natural History of HPV-induced Cervical Cancer. *Clin Infect Dis* 2017;65(6):893-9.
17. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex Transm Dis* 2014;41(11):660-4.

18. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 364(9446):1678-83.
19. Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med* 2018;7(10):5217-36.
20. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12(2):186-92.
21. SAPTGlyC- SOGIBA- FASGO. Prevención primaria y secundaria del cáncer cervicouterino: "Manejo del tamizaje anormal y de las lesiones histológicas del cuello uterino". 2022.
22. Arrossi S. Prevención del Cáncer Cervicouterino. Recomendaciones para el tamizaje, seguimiento y tratamiento de mujeres en el marco de programas de tamizaje basados en el test de VPH. 2015.
23. Ntuli L, Mtshali A, Mzobe G, Liebenberg LJ, Ngcapu S. Role of Immunity and Vaginal Microbiome in Clearance and Persistence of Human Papillomavirus Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12.
24. Prof. Dra. Farinati A, Dr. Orsini A. Flujo Vaginal (Vaginitis-Vaginosis-Cervicitis) Abordaje Integral del diagnóstico y tratamiento de las infecciones que producen flujo vaginal. 2da Edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Ascune; 2020.
25. Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007;21(3):347-54.
26. Larsen B, Monif GRG. Understanding the Bacterial Flora of the Female Genital Tract [Internet]. 2001. Available from: <http://cid.oxfordjournals.org/>
27. Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol* [Internet] 2012 [citado 2023 jul 23];66:371-89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22746335/>
28. Saraf VS, Sheikh SA, Ahmad A, Gillevet PM, Bokhari H, Javed S. Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Arch Microbiol* 2021;203(7):3793-802.
29. Fredricks DN. Molecular methods to describe the spectrum and dynamics of the vaginal microbiota. *Anaerobe* 2011;17(4):191-5.
30. Buchta V. Vaginal microbiome. *Ceska Gynekol* 2018;83(5):371-9.
31. Kwon MS, Lee HK. Host and Microbiome Interplay Shapes the Vaginal Microenvironment. *Front Immunol* 2022;13.
32. Chen X, Lu Y, Chen T, Li R. The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet] 2021 [citado 2023 jul 23];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33898328/>
33. Deka N, Hassan S, Seghal Kiran G, Selvin J. Insights into the role of vaginal microbiome in women's health. *J Basic Microbiol* 2021;61(12):1071-84.
34. Greenbaum S, Greenbaum G, Moran-Gilad J, Weintraub AY. Ecological dynamics of the vaginal microbiome in relation to health and disease. *Am J Obstet Gynecol* 2019;220(4):324-35.
35. Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, et al. The vaginal microbiome: New information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG* 2011;118(5):533-49.
36. Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P, et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J* 2007;1(2):121-33.

37. van de Wijkert JHHM, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H, et al. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One* 2014;9(8):e105998.
38. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 2005;353(18):1899-911.
39. 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(Suppl 1):4680-7.
40. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UME, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012;4(132):132ra52.
41. Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol* 2017;595(2):451-63.
42. Amabebe E, Anumba DOC. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:181.
43. Lewis FMT, Bernstein KT, Aral SO. Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases. *Obstetrics and gynecology* 2017;129(4):643-54.
44. Clarke MA, Rodriguez AC, Gage JC, Herrero R, Hildesheim A, Wacholder S, et al. A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis* 2012;12:33.
45. Straight SW, Herman B, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* 1995;69(5):3185-92.
46. Edwards VL, Smith SB, McComb EJ, Tamarelle J, Ma B, Humphrys MS, et al. The Cervicovaginal Microbiota-Host Interaction Modulates Chlamydia trachomatis Infection. *mBio* 2019;10(4).
47. Martín R, Soberón N, Vázquez F, Suárez JE. Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(3):160-7.
48. Strus M, Brzychczy-Włoch M, Gosiewski T, Kochan P, Heczko PB. The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;48(1):56-63.
49. Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, et al. Identification and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production of Vaginal Lactobacilli from Pregnant Women at High Risk of Preterm Birth and Relation with Outcome. *J Clin Microbiol* 2004;42(2):713-7.
50. Diep D, Nes I. Ribosomally Synthesized Antibacterial Peptides in Gram Positive Bacteria. *Curr Drug Targets* 2002;3(2):107-22.
51. Yamamoto T, Zhou X, Williams CJ, Hochwalt A, Forney LJ. Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2009;22(1):11-8.
52. Brotman RM, Ravel J, Bavoil PM, Gravitt PE, Ghanem KG. Microbiome, sex hormones, and immune responses in the reproductive tract: challenges for vaccine development against sexually transmitted infections. *Vaccine* 2014;32(14):1543-52.
53. Hyman RW, Herndon CN, Jiang H, Palm C, Fukushima M, Bernstein D, et al. The dynamics of the vaginal microbiome during infertility therapy with in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(2):105-15.
54. Hickey RJ, Zhou X, Pierson JD, Ravel J, Forney LJ. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Transl Res* 2012;160(4):267-82.

55. Miller EA, Beasley DE, Dunn RR, Archie EA. Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why Is the Human Vaginal Microbiome Unique? *Front Microbiol* 2016;7:1936.
56. Brotman RM, He X, Gajer P, Fadrosh D, Sharma E, Mongodin EF, et al. Association between cigarette smoking and the vaginal microbiota: a pilot study. *BMC Infect Dis* 2014;14:471.
57. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(35):11060-5.
58. Chee WJY, Chew SY, Than LTL. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. *Microb Cell Fact* 2020;19(1):203.
59. 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;5(4).
60. Lurie S. Does intercourse during menses increase the risk for sexually transmitted disease? *Arch Gynecol Obstet* 2010;282(6):627-30.
61. Aflatoonian R, Tuckerman E, Elliott SL, Bruce C, Aflatoonian A, Li TC, et al. Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium. *Hum Reprod* 2007;22(2):586-93.
62. Hasan U. Human papillomavirus (HPV) deregulation of Toll-like receptor 9. *Oncoimmunology* 2014;3(1):e27257.
63. Park MG, Cho S, Oh MM. Menopausal Changes in the Microbiome-A Review Focused on the Genitourinary Microbiome. *Diagnostics (Basel)* 2023;13(6).
64. Muhleisen AL, Herbst-Kralovetz MM. Menopause and the vaginal microbiome. *Maturitas* 2016;91:42-50.
65. Setty P, Rekedal L, Warren MP. Vaginal estrogen use and effects on quality of life and urogenital morbidity in postmenopausal women after publication of the Women's Health Initiative in New York City. *Menopause* 2016;23(1):7-10.
66. Gliniewicz K, Schneider GM, Ridenhour BJ, Williams CJ, Song Y, Farage MA, et al. Comparison of the Vaginal Microbiomes of Premenopausal and Postmenopausal Women. *Front Microbiol* 2019;10:193.
67. Kenyon C, Colebunders R, Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 2013;209(6):505-23.
68. Fettweis JM, Brooks JP, Serrano MG, Sheth NU, Girerd PH, Edwards DJ, et al. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology (Reading)* 2014;160(Pt 10):2272-82.
69. Gautam R, Borgdorff H, Jaspers V, Francis SC, Verhelst R, Mwaura M, et al. Correlates of the molecular vaginal microbiota composition of African women. *BMC Infect Dis* 2015;15:86.
70. Jaspers V, van de Wijgert J, Cools P, Verhelst R, Verstraelen H, Delany-Moretlwe S, et al. The significance of Lactobacillus crispatus and L. vaginalis for vaginal health and the negative effect of recent sex: a cross-sectional descriptive study across groups of African women. *BMC Infect Dis* 2015;15:115.
71. Blekhman R, Goodrich JK, Huang K, Sun Q, Bukowski R, Bell JT, et al. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biol* 2015;16(1):191.
72. Genc MR, Vardhana S, Delaney ML, Onderdonk A, Tuomala R, Norwitz E, et al. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine

- responses in pregnant women. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2004;116(2):152-6.
73. Zhang C, Yang Z, Luo P, Li T, Wang S, Sun F, et al. Association of TLR4 and TLR9 gene polymorphisms with cervical HR-HPV infection status in Chinese Han population. *BMC Infect Dis* 2023;23(1):152.
  74. Fichorova RN, Chen PL, Morrison CS, Doncel GF, Mendonca K, Kwok C, et al. The Contribution of Cervicovaginal Infections to the Immunomodulatory Effects of Hormonal Contraception. *mBio* 2015;6(5):e00221-15.
  75. Ratten LK, Plummer EL, Bradshaw CS, Fairley CK, Murray GL, Garland SM, et al. The Effect of Exogenous Sex Steroids on the Vaginal Microbiota: A Systematic Review. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:732423.
  76. Brooks JP, Edwards DJ, Blithe DL, Fettweis JM, Serrano MG, Sheth NU, et al. Effects of combined oral contraceptives, depot medroxyprogesterone acetate and the levonorgestrel-releasing intrauterine system on the vaginal microbiome. *Contraception* 2017;95(4):405-13.
  77. Fosch SE, Ficooseco CA, Marchesi A, Cocucci S, Nader-Macias MEF, Perazzi BE. Contraception: Influence on Vaginal Microbiota and Identification of Vaginal Lactobacilli Using MALDI-TOF MS and 16S rDNA Sequencing. *Open Microbiol J* 2018;12:218-29.
  78. Bassis CM, Allsworth JE, Wahl HN, Sack DE, Young VB, Bell JD. Effects of intrauterine contraception on the vaginal microbiota. *Contraception* 2017;96(3):189-95.
  79. Bastianelli C, Farris M, Bianchi P, Benagiano G. The effect of different contraceptive methods on the vaginal microbiome. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2021;14(7):821-36.
  80. Liechty ER, Bergin IL, Bassis CM, Chai D, LeBar W, Young VB, et al. The levonorgestrel-releasing intrauterine system is associated with delayed endocervical clearance of *Chlamydia trachomatis* without alterations in vaginal microbiota. *Pathog Dis* 2015;73(8):ftv070.
  81. Donders GGG, Bellen G, Ruban K, Van Bulck B. Short- and long-term influence of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (Mirena®) on vaginal microbiota and *Candida*. *J Med Microbiol* 2018;67(3):308-13.
  82. Giraldo PC, Souza TC de, Henrique GL, Monteiro I, Amaral R, Machado RB, et al. Reactional changes in short-term levonorgestrel-releasing intrauterine system (Ing-ius) use. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 2019;65(6):857-63.
  83. De Seta F, Restaino S, De Santo D, Stabile G, Banco R, Busetti M, et al. Effects of hormonal contraception on vaginal flora. *Contraception* 2012;86(5):526-9.
  84. Green J, Berrington de Gonzalez A, Smith JS, Franceschi S, Appleby P, Plummer M, et al. Human papillomavirus infection and use of oral contraceptives. *Br J Cancer* 2003;88(11):1713-20.
  85. Veldhuijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ, van de Wijgert JH. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *Lancet Infect Dis* 2010;10(12):862-74.
  86. 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;5(4).
  87. El-Zein M, Ramanakumar A V, Naud P, Roteli-Martins CM, de Carvalho NS, Colares de Borba P, et al. Determinants of Acquisition and Clearance of Human Papillomavirus Infection in Previously Unexposed Young Women. *Sex Transm Dis* 2019;46(10):663-9.

88. Chernes TL, Hillier SL, Meyn LA, Busch JL, Krohn MA. A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis* 2008;35(1):78-83.
89. Fethers KA, Fairley CK, Hocking JS, Gurrin LC, Bradshaw CS. Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2008;47(11):1426-35.
90. Jespers V, Crucitti T, Menten J, Verhelst R, Mwaura M, Mandaliya K, et al. Prevalence and correlates of bacterial vaginosis in different sub-populations of women in sub-Saharan Africa: a cross-sectional study. *PLoS One* 2014;9(10):e109670.
91. Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, McQuillan G, Kendrick J, Sutton M, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis* 2007;34(11):864-9.
92. Forcey DS, Vodstrcil LA, Hocking JS, Fairley CK, Law M, McNair RP, et al. Factors Associated with Bacterial Vaginosis among Women Who Have Sex with Women: A Systematic Review. *PLoS One* 2015;10(12):e0141905.
93. Marrazzo JM, Thomas KK, Agnew K, Ringwood K. Prevalence and risks for bacterial vaginosis in women who have sex with women. *Sex Transm Dis* 2010;37(5):335-9.
94. Bradshaw CS, Walker SM, Vodstrcil LA, Bilardi JE, Law M, Hocking JS, et al. The influence of behaviors and relationships on the vaginal microbiota of women and their female partners: the WOW Health Study. *J Infect Dis* 2014;209(10):1562-72.
95. Marrazzo JM, Fiedler TL, Srinivasan S, Thomas KK, Liu C, Ko D, et al. Extravaginal reservoirs of vaginal bacteria as risk factors for incident bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 2012;205(10):1580-8.
96. Khan AM, Freeman-Wang T, Pisal N, Singer A. Smoking and multicentric vulval intraepithelial neoplasia. *J Obstet Gynaecol* 2009;29(2):123-5.
97. Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun* 2010;34(3):J258-65.
98. Han H, Huang W, Du W, Shen Q, Yang Z, Li MD, et al. Involvement of Interferon Regulatory Factor 7 in Nicotine's Suppression of Antiviral Immune Responses. *J Neuroimmune Pharmacol* 2019;14(4):551-64.
99. Nelson TM, Borgogna JC, Michalek RD, Roberts DW, Rath JM, Glover ED, et al. Cigarette smoking is associated with an altered vaginal tract metabolomic profile. *Sci Rep* 2018;8(1):852.
100. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 2016;65(2):330-9.
101. Lin HY, Fu Q, Kao YH, Tseng TS, Reiss K, Cameron JE, et al. Antioxidants Associated With Oncogenic Human Papillomavirus Infection in Women. *J Infect Dis* 2021;224(9):1520-8.
102. Neggers YH, Nansel TR, Andrews WW, Schwebke JR, Yu K fun, Goldenberg RL, et al. Dietary intake of selected nutrients affects bacterial vaginosis in women. *J Nutr* 2007;137(9):2128-33.
103. Tohill BC, Heilig CM, Klein RS, Rompalo A, Cu-Uvin S, Piwoz EG, et al. Nutritional biomarkers associated with gynecological conditions among US women with or at risk of HIV infection. *Am J Clin Nutr* 2007;85(5):1327-34.
104. Barchitta M, Maugeri A, La Mastra C, Rosa MC La, Favara G, Lio RMS, et al. Dietary Antioxidant Intake and Human Papillomavirus Infection: Evidence from a Cross-Sectional Study in Italy. *Nutrients* 2020;12(5).

105. Thoma ME, Klebanoff MA, Rovner AJ, Nansel TR, Neggers Y, Andrews WW, et al. Bacterial vaginosis is associated with variation in dietary indices. *J Nutr* 2011;141(9):1698-704.
106. Naresh A, Hagensee M, Myers L, Cameron J. Association of Diet Quality and Dietary Components with Clinical Resolution of HPV. *Nutr Cancer* 2021;73(11-12):2579-88.
107. Centers for Disease Control (CDC). Toxic-shock syndrome, United States, 1970-1982. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1982;31(16):201-4.
108. Hickey RJ, Abdo Z, Zhou X, Nemeth K, Hansmann M, Osborn TW, et al. Effects of tampons and menses on the composition and diversity of vaginal microbial communities over time. *BJOG* 2013;120(6):695-706.
109. van Eijk AM, Zulaika G, Lenchner M, Mason L, Sivakami M, Nyothach E, et al. Menstrual cup use, leakage, acceptability, safety, and availability: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Public Health* 2019;4(8):e376-93.
110. Tessandier N, Uysal IB, Elie B, Selinger C, Bernat C, Boué V, et al. Does exposure to different menstrual products affect the vaginal environment? *Mol Ecol* 2023;32(10):2592-601.
111. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, Andrews WW, Schwebke JR, Zhang J, et al. A longitudinal study of vaginal douching and bacterial vaginosis--a marginal structural modeling analysis. *Am J Epidemiol* 2008;168(2):188-96.
112. O'Brien KM, Weinberg CR, D'Aloisio AA, Moore KR, Sandler DP. The association between douching, genital talc use, and the risk of prevalent and incident cervical cancer. *Sci Rep* 2021;11(1):14836.
113. Low N, Chersich MF, Schmidlin K, Egger M, Francis SC, van de Wijgert JHHM, et al. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and HIV infection in women: individual participant data meta-analysis. *PLoS Med* 2011;8(2):e1000416.
114. Fashemi B, Delaney ML, Onderdonk AB, Fichorova RN. Effects of feminine hygiene products on the vaginal mucosal biome. *Microb Ecol Health Dis* 2013;24.
115. del Campo-Moreno R, Alarcón-Cavero T, D'Auria G, Delgado-Palacio S, Ferrer-Martínez M. Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2018;36(4):241-5.
116. Foschi C, Laghi L, Parolin C, Giordani B, Compri M, Cevenini R, et al. Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and 1H-NMR. *PLoS One* 2017;12(2):e0172483.
117. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013;26(3):547-603.
118. Buchan BW, Ledebor NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013;51(5):1359-66.
119. Goncalves Ribeiro T. Lactobacillus Species Combinations and Shifts Overtime in the Healthy Female Urogenital Tract. *Online Worldwide*: 2021.
120. Anderson AC, Sanunu M, Schneider C, Clad A, Karygianni L, Hellwig E, et al. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol* 2014;14(1):312.
121. Happel AU, Kullin B, Gamielien H, Wentzel N, Zauchenberger CZ, Jaspan HB, et al. Exploring potential of vaginal Lactobacillus isolates from South African women for enhancing treatment for bacterial vaginosis. *PLoS Pathog* 2020;16(6):e1008559.

122. Susuki V, Tatti S. Caracterización de la microbiota vaginal en mujeres con lesiones producidas por el virus del papiloma humano. *Revista Bioquímica Y Patología Clínica* 2021;84(2):34-42.
123. Palaoro L, Perazzi B. Estudio de la Disfunción Vaginal. 2018.
124. Abou Chacra L, Fenollar F, Diop K. Bacterial Vaginosis: What Do We Currently Know? *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:672429.
125. Brotman RM, Gajer P, Holm J, Robinson CK, Ma B, Humphrys M, et al. Hormonal contraception is associated with stability and lactobacillus-dominance of the vaginal microbiota in a two-year observational study. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215(6):S828-9.
126. Bradley F, Birse K, Hasselrot K, Noël-Romas L, Introini A, Wefer H, et al. The vaginal microbiome amplifies sex hormone-associated cyclic changes in cervicovaginal inflammation and epithelial barrier disruption. *Am J Reprod Immunol* 2018;80(1):e12863.
127. Torcia MG. Interplay among vaginal microbiome, immune response and sexually transmitted viral infections. *Int J Mol Sci* 2019;20(2).
128. Brotman RM, Bradford LL, Conrad M, Gajer P, Ault K, Peralta L, et al. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sex Transm Dis* 2012;39(10):807-12.
129. van de Wijgert JHHM, Jaspers V. The global health impact of vaginal dysbiosis. *Res Microbiol* 2017;168(9-10):859-64.
130. Vieira-Baptista P, Stockdale CK, Sobel J. International Society for the Study of Vulvovaginal Disease recommendations for the diagnosis and treatment of vaginitis. 2023.
131. Ravel J, Brotman RM, Gajer P, Ma B, Nandy M, Fadrosch DW, et al. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome* 2013;1(1):29.
132. Janulaitiene M, Gegzna V, Baranauskiene L, Bulavaitė A, Simanavicius M, Pleckaityte M. Phenotypic characterization of *Gardnerella vaginalis* subgroups suggests differences in their virulence potential. *PLoS One* 2018;13(7):e0200625.
133. Vaneechoutte M, Guschin A, Van Simaey L, Gansemans Y, Van Nieuwerburgh F, Cools P. Emended description of *Gardnerella vaginalis* and description of *Gardnerella leopoldii* sp. nov., *Gardnerella piotii* sp. nov. and *Gardnerella swidsinskii* sp. nov., with delineation of 13 genomic species within the genus *Gardnerella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2019;69(3):679-87.
134. 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(1):14-22.
135. 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.
136. 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.
137. 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.
138. Guo YL, You K, Qiao J, Zhao Y m, Geng L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *Int J STD AIDS* 2012;23(8):581-4.
139. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol* 2016;42(6):905-27.

140. Donders G, Bellen G, Byttebier G, Verguts L, Hinoul P, Walckiers R, et al. Individualized decreasing-dose maintenance fluconazole regimen for recurrent vulvovaginal candidiasis (ReCiDiF trial). *Am J Obstet Gynecol* 2008;199(6):613.e1-9.
141. Krüger W, Vielreicher S, Kapitan M, Jacobsen ID, Niemiec MJ. Fungal-Bacterial Interactions in Health and Disease. *Pathogens* 2019;8(2).
142. Sustr V, Foessleitner P, Kiss H, Farr A. Vulvovaginal Candidosis: Current Concepts, Challenges and Perspectives. *J Fungi (Basel)* 2020;6(4).
143. Oriel JD, Waterworth PM. Effects of minocycline and tetracycline on the vaginal yeast flora. *J Clin Pathol* 1975;28(5):403-6.
144. Swidsinski A, Guschin A, Tang Q, Dörffel Y, Verstraelen H, Tertychnyy A, et al. Vulvovaginal candidiasis: histologic lesions are primarily polymicrobial and invasive and do not contain biofilms. *Am J Obstet Gynecol* 2019;220(1):91.e1-91.e8.
145. Donders GGG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 2002;109(1):34-43.
146. Donders GGG, Bellen G, Grinceviciene S, Ruban K, Vieira-Baptista P. Aerobic vaginitis: no longer a stranger. *Res Microbiol* 2017;168(9-10):845-58.
147. Ghartey JP, Smith BC, Chen Z, Buckley N, Lo Y, Ratner AJ, et al. *Lactobacillus crispatus* dominant vaginal microbiome is associated with inhibitory activity of female genital tract secretions against *Escherichia coli*. *PLoS One* 2014;9(5):e96659.
148. Kaambo E, Africa C, Chambuso R, Passmore JAS. Vaginal Microbiomes Associated With Aerobic Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Front Public Health* 2018;6:78.
149. Miguens M, Orsini A. Causas de flujo vaginal asociado a prurito o ardor vulvovaginal. *Colposcopia* 2013;24(1):16-25.
150. Plisko O, Zodzika J, Jermakova I, Pcolkina K, Prusakevica A, Liepniece-Karele I, et al. Aerobic Vaginitis-Underestimated Risk Factor for Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(1).
151. Jahic M, Mulavdic M, Hadzimehmedovic A, Jahic E. Association between aerobic vaginitis, bacterial vaginosis and squamous intraepithelial lesion of low grade. *Med Arch* 2013;67(2):94-6.
152. Fu J, Zhang H. Meta-analysis of the correlation between vaginal microenvironment and HPV infection. *Am J Transl Res* 2023;15(2):630-40.
153. Parolin C, Frisco G, Foschi C, Giordani B, Salvo M, Vitali B, et al. *Lactobacillus crispatus* BC5 Interferes With *Chlamydia trachomatis* Infectivity Through Integrin Modulation in Cervical Cells. *Front Microbiol* 2018;9:2630.
154. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome* 2013;1(1):12.
155. Petrova MI, Reid G, Vanechoutte M, Lebeer S. *Lactobacillus iners* : Friend or Foe? *Trends Microbiol* 2017;25(3):182-91.
156. Zheng N, Guo R, Wang J, Zhou W, Ling Z. Contribution of *Lactobacillus iners* to Vaginal Health and Diseases: A Systematic Review. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:792787.
157. Pendharkar S, Skaft-Holm A, Simsek G, Haahr T. *Lactobacilli* and Their Probiotic Effects in the Vagina of Reproductive Age Women. *Microorganisms* 2023;11(3).

158. van Houdt R, Ma B, Bruisten SM, Speksnijder AGCL, Ravel J, de Vries HJC. Lactobacillus iners-dominated vaginal microbiota is associated with increased susceptibility to Chlamydia trachomatis infection in Dutch women: a case-control study. *Sex Transm Infect* 2018;94(2):117-23.
159. Tamarelle J, Shardell MD, Ravel J, Brotman RM. Factors Associated With Incidence and Spontaneous Clearance of Molecular-Bacterial Vaginosis: Results From a Longitudinal Frequent-Sampling Observational Study. *Sex Transm Dis* 2022;49(9):649-56.
160. Tamarelle J, de Barbeyrac B, Le Hen I, Thiébaud A, Bébéar C, Ravel J, et al. Vaginal microbiota composition and association with prevalent Chlamydia trachomatis infection: a cross-sectional study of young women attending a STI clinic in France. *Sex Transm Infect* 2018;94(8):616-8.
161. Tamarelle J, Ma B, Gajer P, Humphrys MS, Terplan M, Mark KS, et al. Nonoptimal Vaginal Microbiota After Azithromycin Treatment for Chlamydia trachomatis Infection. *J Infect Dis* 2020;221(4):627-35.
162. Muzny CA, Blanchard E, Taylor CM, Aaron KJ, Talluri R, Griswold ME, et al. Identification of Key Bacteria Involved in the Induction of Incident Bacterial Vaginosis: A Prospective Study. *J Infect Dis* 2018;218(6):966-78.
163. Tortelli BA, Lewis WG, Allsworth JE, Member-Meneh N, Foster LR, Reno HE, et al. Associations between the vaginal microbiome and Candida colonization in women of reproductive age. *Am J Obstet Gynecol* 2020;222(5):471.e1-471.e9.
164. McKloud E, Delaney C, Sherry L, Kean R, Williams S, Metcalfe R, et al. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: a Dynamic Interkingdom Biofilm Disease of Candida and Lactobacillus. *mSystems* 2021;6(4):e0062221.
165. Novak J, Ravel J, Ma B, Ferreira CST, Tristão A da R, Silva MG, et al. Characteristics associated with Lactobacillus iners-dominated vaginal microbiota. *Sex Transm Infect* 2022;98(5):353-9.
166. Nunn KL, Wang YY, Harit D, Humphrys MS, Ma B, Cone R, et al. Enhanced Trapping of HIV-1 by Human Cervicovaginal Mucus Is Associated with Lactobacillus crispatus-Dominant Microbiota. *mBio* 2015;6(5):e01084-15.
167. De Seta F, Campisciano G, Zanotta N, Ricci G, Comar M. The Vaginal Community State Types Microbiome-Immune Network as Key Factor for Bacterial Vaginosis and Aerobic Vaginitis. *Front Microbiol* 2019;10:2451.
168. Leizer J, Nasioudis D, Forney LJ, Schneider GM, Gliniewicz K, Boester A, et al. Properties of Epithelial Cells and Vaginal Secretions in Pregnant Women When Lactobacillus crispatus or Lactobacillus iners Dominate the Vaginal Microbiome. *Reproductive Sciences* 2018;25(6):854-60.
169. Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, Lee YS, Bennett PR, Kyrgiou M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: What do we know and where are we going next? *Microbiome* 2016;4.
170. Munoz A, Hayward MR, Bloom SM, Rocafort M, Ngcapu S, Mafunda NA, et al. Modeling the temporal dynamics of cervicovaginal microbiota identifies targets that may promote reproductive health. *Microbiome* 2021;9(1):163.
171. Holm JB, Carter KA, Ravel J, Brotman RM. Lactobacillus iners and genital health: molecular clues to an enigmatic vaginal species. *Curr Infect Dis Rep* 2023;25(4):67-75.
172. Beghini J, Linhares IM, Giraldo PC, Ledger WJ, Witkin SS. Differential expression of lactic acid isomers, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and matrix metalloproteinase-8 in vaginal fluid from women with vaginal disorders. *BJOG* 2015;122(12):1580-5.

173. Oh HY, Kim BS, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Park SY, et al. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin Microbiol Infect* 2015;21(7):674.e1-9.
174. Borges S, Silva J, Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet* 2014;289(3):479-89.
175. Ventolini G, Gandhi K, Manales NJ, Garza J, Sanchez A, Martinez B. Challenging Vaginal Discharge, Lactobacillosis and Cytolytic Vaginitis. *J Family Reprod Health* 2022;16(2):102-5.
176. Kraut R, Carvallo FD, Golonka R, Campbell SM, Rehmani A, Babenko O, et al. Scoping review of cytolytic vaginosis literature. *PLoS One* 2023;18(1):e0280954.
177. Datcu R. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. *Dan Med J* 2014;61(4):B4830.
178. Xu H, Zhang X, Yao W, Sun Y, Zhang Y. Characterization of the vaginal microbiome during cytolytic vaginosis using high-throughput sequencing. *J Clin Lab Anal* 2019;33(1):e22653.
179. Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, Pradere JP, Jang MK, Mederacke I, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* 2012;21(4):504-16.
180. Samaras V, Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Peppas G, Falagas ME. Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review. *J Infect Dev Ctries* 2010;4(5):267-81.
181. Chase D, Goulder A, Zenhausern F, Monk B, Herbst-Kralovetz M. The vaginal and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: a review of applications in etiology, symptoms and treatment. *Gynecol Oncol* 2015;138(1):190-200.
182. 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(5):e63514.
183. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep* 2015;5:16865.
184. Oh HY, Kim BS, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Park SY, et al. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin Microbiol Infect* 2015;21(7):674.e1-9.
185. Kwasniewski W, Wolun-Cholewa M, Kotarski J, Warchol W, Kuzma D, Kwasniewska A, et al. Microbiota dysbiosis is associated with HPV-induced cervical carcinogenesis. *Oncol Lett* 2018;16(6):7035-47.
186. 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(1):7593.
187. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Tracy JK, Zenilman JM, Ravel J, et al. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *J Infect Dis* 2014;210(11):1723-33.
188. Nelson TM, Borgogna JLC, Brotman RM, Ravel J, Walk ST, Yeoman CJ. Vaginal biogenic amines: biomarkers of bacterial vaginosis or precursors to vaginal dysbiosis? *Front Physiol* 2015;6:253.
189. Srinivasan S, Morgan MT, Fiedler TL, Djukovic D, Hoffman NG, Raftery D, et al. Metabolic signatures of bacterial vaginosis. *mBio* 2015;6(2).
190. Williams VM, Filippova M, Filippov V, Payne KJ, Duerksen-Hughes P. Human papillomavirus type 16 E6 induces oxidative stress and DNA damage. *J Virol* 2014;88(12):6751-61.

191. Hickey DK, Patel M V, Fahey J V, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol* 2011;88(2):185-94.
192. Gosmann C, Mattarollo SR, Bridge JA, Frazer IH, Blumenthal A. IL-17 suppresses immune effector functions in human papillomavirus-associated epithelial hyperplasia. *J Immunol* 2014;193(5):2248-57.
193. Xue J, Wang Y, Chen C, Zhu X, Zhu H, Hu Y. Effects of Th17 cells and IL-17 in the progression of cervical carcinogenesis with high-risk human papillomavirus infection. *Cancer Med* 2018;7(2):297-306.
194. Nicolò S, Tanturli M, Mattiuz G, Antonelli A, Baccani I, Bonaiuto C, et al. Vaginal Lactobacilli and Vaginal Dysbiosis-Associated Bacteria Differently Affect Cervical Epithelial and Immune Homeostasis and Anti-Viral Defenses. *Int J Mol Sci* 2021;22(12).
195. Champer M, Wong AM, Champer J, Brito IL, Messer PW, Hou JY, et al. The role of the vaginal microbiome in gynaecological cancer. *BJOG* 2018;125(3):309-15.
196. Seo SS, Oh HY, Lee JK, Kong JS, Lee DO, Kim MK. Combined effect of diet and cervical microbiome on the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Nutr* 2016;35(6):1434-41.
197. 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(4):e0153274.
198. Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2013;13:271.
199. Piyathilake CJ, Ollberding NJ, Kumar R, Macaluso M, Alvarez RD, Morrow CD. Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses. *Cancer Prev Res (Phila)* 2016;9(5):357-66.
200. Mei L, Wang T, Chen Y, Wei D, Zhang Y, Cui T, et al. Dysbiosis of vaginal microbiota associated with persistent high-risk human papilloma virus infection. *J Transl Med* 2022;20(1):12.
201. Brotman RM. Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective. *J Clin Invest* 2011;121(12):4610-7.
202. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW, Zhang J, et al. Bacterial Vaginosis Assessed by Gram Stain and Diminished Colonization Resistance to Incident Gonococcal, Chlamydial, and Trichomonal Genital Infection. *J Infect Dis* 2010;202(12):1907-15.
203. St. Amant DC, Valentin-Bon IE, Jerse AE. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* Species That Are Commonly Isolated from the Female Genital Tract. *Infect Immun* 2002;70(12):7169-71.
204. Beatty WL. Lysosome repair enables host cell survival and bacterial persistence following *Chlamydia trachomatis* infection. *Cell Microbiol* 2007;9(9):2141-52.
205. Brown HM, Knowlton AE, Grieshaber SS. Chlamydial infection induces host cytokinesis failure at abscission. *Cell Microbiol* 2012;14(10):1554-67.
206. Knowlton AE, Brown HM, Richards TS, Andreolas LA, Patel RK, Grieshaber SS. *Chlamydia trachomatis* infection causes mitotic spindle pole defects independently from its effects on centrosome amplification. *Traffic* 2011;12(7):854-66.
207. Chumduri C, Gurumurthy RK, Zadora PK, Mi Y, Meyer TF. *Chlamydia* infection promotes host DNA damage and proliferation but impairs the DNA damage response. *Cell Host Microbe* 2013;13(6):746-58.

208. Ye H, Song T, Zeng X, Li L, Hou M, Xi M. Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2018;297(6):1377-87.
209. Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, Low N, Unemo M, Abu-Raddad LJ, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ* 2019;97(8):548-562P.
210. Fichorova RN, Buck OR, Yamamoto HS, Fashemi T, Dawood HY, Fashemi B, et al. The villain team-up or how *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis alter innate immunity in concert. *Sex Transm Infect* 2013;89(6):460-6.
211. Kissinger P, Adamski A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sex Transm Infect* 2013;89(6):426-33.
212. Lazenby GB, Taylor PT, Badman BS, McHaki E, Korte JE, Soper DE, et al. An association between *Trichomonas vaginalis* and high-risk human papillomavirus in rural Tanzanian women undergoing cervical cancer screening. *Clin Ther* 2014;36(1):38-45.
213. Yang S, Zhao W, Wang H, Wang Y, Li J, Wu X. *Trichomonas vaginalis* infection-associated risk of cervical cancer: A meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2018;228:166-73.
214. Chernes TL, Meyn LA, Krohn MA, Lurie JG, Hillier SL. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2003;37(3):319-25.
215. Nagot N, Ouedraogo A, Defer MC, Vallo R, Mayaud P, Van de Perre P. Association between bacterial vaginosis and Herpes simplex virus type-2 infection: implications for HIV acquisition studies. *Sex Transm Infect* 2007;83(5):365-8.
216. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS* 2008;22(12):1493-501.
217. Pyles RB, Vincent KL, Baum MM, Elsom B, Miller AL, Maxwell C, et al. Cultivated vaginal microbiomes alter HIV-1 infection and antiretroviral efficacy in colonized epithelial multilayer cultures. *PLoS One* 2014;9(3):e93419.
218. Cone RA. Vaginal microbiota and sexually transmitted infections that may influence transmission of cell-associated HIV. *J Infect Dis* 2014;210 Suppl 3(Suppl 3):S616-21.
219. Armstrong E, Kaul R. Beyond bacterial vaginosis: vaginal lactobacilli and HIV risk. *Microbiome* 2021;9(1):239.
220. Liu G, Sharma M, Tan N, Barnabas R V. HIV-positive women have higher risk of human papilloma virus infection, precancerous lesions, and cervical cancer. *AIDS* 2018;32(6):795-808.
221. World Health Organization. Guidelines for the treatment of *Chlamydia trachomatis*. : <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246165/9789241549714-eng.pdf;jsessionid=BD28F9646988F52482A01238079554F7?sequence=12020>;
222. Madden T, Grentzer JM, Secura GM, Allsworth JE, Peipert JF. Risk of bacterial vaginosis in users of the intrauterine device: a longitudinal study. *Sex Transm Dis* 2012;39(3):217-22.
223. Kervinen K, Holster T, Saqib S, Virtanen S, Stefanovic V, Rahkonen L, et al. Parity and gestational age are associated with vaginal microbiota composition in term and late term pregnancies. *EBioMedicine* 2022;81:104107.