

ARTÍCULO ORIGINAL

Caracterización de la microbiota vaginal en mujeres con lesiones producidas por el virus del papiloma humano.

Perazzi, Beatriz Elizabeth^{1*}; Payalef, Sandra Noemi¹; Gomez Cherey, Facundo²; Reyes, Ana Paula¹; Guridi, Lucia²; Losada, Mirta¹; Blanco, Analía²; Caruso, Ricardo²; Cora Eliseht, Martha²; Susuki, Verónica²; Tinirello, María de los Ángeles²; Cardinal, Lucía³; Maldonado, Verónica²; Fleider, Laura²; Vay, Carlos¹; Diaz, Lili³; Famiglietti, Angela¹; Tatti, Silvio².

¹Laboratorio de Bacteriología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Programa de Diagnóstico, Terapéutica y Vacunación del Tracto Genital Inferior, División Ginecología y Obstetricia, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³División Patología Ginecológica, Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Perazzi, Beatriz Elizabeth, Hospital de Clínicas, Lavalleja 2726 (C.P. 1824), Lanús Oeste. Buenos Aires, Argentina; beatrizpe-
razzi@gmail.com; bperazzi@ffyb.uba.ar.

Resumen

Introducción: la microbiota vaginal es un sistema de microorganismos en equilibrio, que varía desde el nacimiento (predominio lactobacilos) hasta la menarca (microbiota intermedia, bacterias de piel e intestino). Es conocido que microbioma vaginal balanceado puede prevenir las infecciones del tracto genital inferior; la falta de lactobacilos favorece el desarrollo de vaginosis bacteriana (VB) e infecciones de transmisión sexual, como el virus del papiloma humano (VPH). **Objetivos:** evaluar la disfunción vaginal mediante los estados vaginales básicos (EVB) y caracterizar la microbiota lactobacilar en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de alto (HSIL) y bajo grado (LSIL) por VPH, en comparación con un grupo control. **Materiales y métodos:** estudio consecutivo, prospectivo, transversal. Se examinaron pacientes de entre 18 y 50 años, con inicio de relaciones sexuales. Se realizó examen clínico y se tomó hisopado de fondo de saco vaginal para estudiar EVB mediante BACOVA y cultivo. Se identificaron las especies de *Lactobacillus* mediante espectrometría de masa. **Resultados:** se analizaron 760 pacientes, grupo 1 (n=175, 18 a 24 años) y grupo 2 (n=585, 25 a 50 años). La prevalencia desbalance del contenido vaginal fue: grupo 1 control 37,9 % (50/132), LSIL 56,7 % (17/30, p=0,047) y HSIL 66,7 % (8/12, p=0,05); y grupo 2: control 39,4 % (196/498), LSIL 50,0 % (23/46, p=0,21) y HSIL 48,6 % (18/37, p=0,17). La vaginosis más prevalente fue la bacteriana en ambos grupos (p < 0,001), grupo 1: control 35,6 %; LSIL 46,7 %, HSIL 58,3 % y grupo 2: control 32,5 %; LSIL 47,8 %, HSIL 43,2 %. Las pacientes HSIL tuvieron prevalencia de 21,4 % de *Lactobacillus crispatus* y 46,2 % de *Lactobacillus jensenii*. **Conclusiones:** se observó mayor desbalance vaginal en el grupo HSIL, con baja prevalencia de *L. crispatus* (especie protectora) e incremento de *L. jensenii* (con menor rol protector de la disfunción vaginal). Es importante caracterizar las especies de *Lactobacillus*, dado que el incremento de especies no protectoras en este grupo de pacientes alteran el microambiente vaginal y actúan como potenciales cofactores en la persistencia de la infección por VPH e incrementan el riesgo de adquirir otras infecciones de transmisión sexual.

Palabras clave: disfunción vaginal, estados vaginales básicos, especies de lactobacilos, virus del Papiloma Humano.

Characterization of the vaginal microbiota in women with lesions caused by the Human Papillomavirus.

Abstract

Introduction: the vaginal microbiota is a system of microorganisms in equilibrium, which varies from birth (predominantly lactobacilli) to menarche (intermediate microbiota, skin and intestine bacteria). It is known that balanced vaginal microbiome can prevent lower genital tract infections; the lack of lactobacillus favors the development of bacterial vaginosis (BV) and sexually transmitted infections, such as human papillomavirus (HPV). **Objectives:** To evaluate the vaginal dysfunction through the basic vaginal states (BVS) by the Balance of the Vaginal Content (BAVACO) methodology and to characterize the lactobacillar microbiota in patients with high- and low-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL and LSIL respectively) due to human

papilloma virus (HPV) compared to a control group. Material and Methods: Consecutive, prospective, cross-sectional study that included patients between 18 and 50 years old with onset of sexual intercourse. All patients underwent clinical examination and collection of vaginal fornix to study BVS by BAVACO and culture. The *Lactobacillus* species present were identified by mass spectrometry. Results: 760 patients were analyzed, group 1 (n = 175, 18 to 24 years) and group 2 (n = 585, 25 to 50 years). The unbalanced prevalence of vaginal content was: group 1 control 37.9% (50/132), LSIL 56.7% (17/30, p = 0.047) and HSIL 66.7% (8/12, p = 0, 05); and group 2: control 39.4% (196/498), LSIL 50.0% (23/46, p = 0.21) and HSIL 48.6% (18/37, p = 0.17). The most prevalent vaginosis was bacterial in both groups (p < 0.001), group 1: control 35.6%; LSIL 46.7%, HSIL 58.3% and group 2: control 32.5%; LSIL 47.8%, HSIL 43.2%. The HSIL patients had a prevalence of 21.4% of *Lactobacillus crispatus* and 46.2% of *Lactobacillus jensenii*. Conclusions: the HSIL group showed a greater unbalance of the vaginal microbiota, with a low prevalence of *L. crispatus* (protective species) and a high prevalence of *L. jensenii* (a species that has a lower protective role of vaginal dysfunction). Therefore, it is important to characterize *Lactobacillus* species, since the increase in non-protective species in this group of patients alters the vaginal microenvironment, acts as potential cofactors in the persistence of HPV infection, and increases the risk of acquiring other sexually transmitted infections.

Keywords: vaginal dysfunction, basic vaginal conditions, lactobacillus species, Human Papillomavirus.

Introducción

La microbiota vaginal es un complejo sistema de microorganismos relacionados entre sí y en permanente equilibrio, que varía desde el nacimiento, con un predominio de lactobacilos en la primera semana de vida hasta la menarca, caracterizada por la presencia de microbiota intermedia correspondiente a bacterias de localización intestinal y de piel. En la pubertad, como consecuencia de la maduración estrogénica, la vagina normal contiene un franco predominio de más de 18 de especies de lactobacilos y, en menor proporción, una gran variedad de especies de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, e inclusive de levaduras. Es entonces admisible reconocer la influencia de la estimulación hormonal, principalmente de origen estrogénico, en la colonización vaginal, con un predominio de lactobacilos [1].

Se ha determinado desde hace tiempo que las bacterias productoras de ácido láctico son las encargadas de mantener en equilibrio la microbiota vaginal, evitando así las infecciones del tracto genitourinario. En las mujeres adultas sanas, el pH vaginal es aproximadamente 4,5 y las especies predominantes de lactobacilos mantienen el pH bajo a través de su actividad de fermentación, que protege el área contra la invasión de microorganismos indeseables [2]. Recientemente, los métodos moleculares han demostrado la presencia de *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. iners* como gérmenes más comunes [3].

Es conocido el hecho de que un microbioma vaginal balanceado puede prevenir las infecciones del tracto genital inferior; la falta de lactobacilos favorece el desarrollo de vaginosis bacteriana (VB) e infecciones de transmisión sexual, como el virus de la inmunodeficiencia humana y virus del papiloma humano (VPH) [4,5]. Sin embargo, evidencia reciente sugiere que el estado del microbioma podría influenciar el desarrollo del cáncer, situación que ya ha sido caracterizada para el microbioma gastrointestinal [6].

En cuanto a la relación entre el cáncer ginecológico y el desbalance del microbioma, el ejemplo más claro encontrado hasta

este momento es el desarrollo de tumores VPH relacionados. Asimismo, la presencia de VPH podría seleccionar el ecosistema microbiano vaginal acompañante. Un estudio demuestra que las mujeres con infección con VPH presentaron en sus microbiomas aumento del contenido de *L. gasseri* y *Gardnerella vaginalis* [7]. En cambio, los microbiomas balanceados demuestran mayor cantidad de *L. crispatus* [8,9].

Factores mecánicos, como las duchas vaginales o las relaciones sexuales, y factores biológicos, como la VB [10,11] o infecciones de transmisión sexual [12], alteran el microambiente vaginal y han sido identificados como cofactores en la persistencia de la infección por VPH. Esto sugiere que factores adicionales actúan en conjunto con el virus de VPH para influenciar en el riesgo del desarrollo de cáncer cervical. Uno de los posibles mecanismos por los cuales puede relacionarse el impacto del microbioma en la oncogénesis se debe al desarrollo de la inflamación crónica, la cual se asocia con las neoplasias cervicales. Es posible que el microbioma cervical esté involucrado en pro-

Figura 1. Estado Vaginal Básico I (microbiota normal): lactobacilos. Observación del contenido vaginal en la coloración de Gram (1000X).

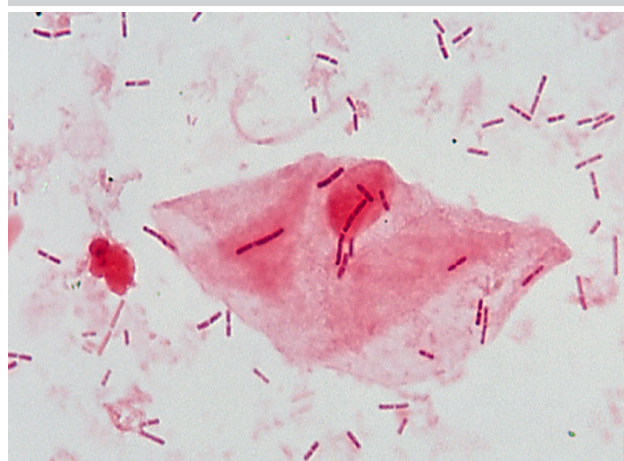


Figura 2. Estado Vaginal Básico II (microbiota normal con reacción inflamatoria): levaduras con pseudohifas. Observación del contenido vaginal en la coloración de Gram (1000X).



mover la expresión de citoquinas inmunosupresoras [13]. La transición a un fenotipo prooncogénico se produciría por un cambio en el infiltrado inflamatorio, el cual estaría dominado por células del sistema inmune que actuarían en la inflamación crónica, como, por ejemplo, macrófagos M2, células T reguladoras (Treg) y células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSC - *myeloid-derived suppressor cells*) [14].

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la disfunción vaginal mediante los estados vaginales básicos (EVB) por metodología del Balance del Contenido Vaginal (BACOVA) y la presencia de microbiota lactobacilar en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de alto (HSIL) y bajo grado (LSIL) por VPH, en comparación con un grupo control, y caracterizar las especies de *Lactobacillus* asociadas a estas lesiones.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio consecutivo, prospectivo, descriptivo, de corte transversal. Se examinaron pacientes entre 18 y 50

Figura 4. Estado Vaginal Básico IV (vaginosis bacteriana): morfotipos compatibles con anaerobios. Observación del contenido vaginal en la coloración de Gram (1000X).

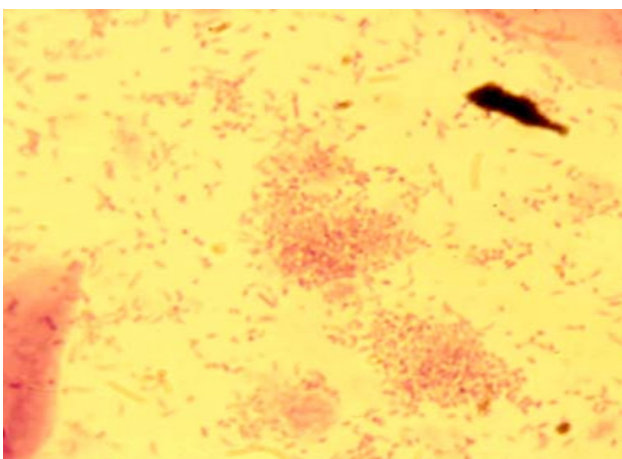
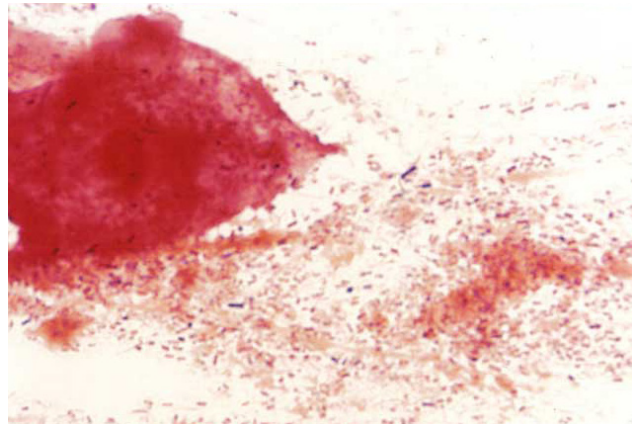


Figura 3. Estado Vaginal Básico III (microbiota intermedia): lactobacilos y morfotipos compatibles con anaerobios. Observación del contenido vaginal en la coloración de Gram (1000X).



años, con inicio de relaciones sexuales atendidas en el Programa de Prevención, Diagnóstico, Terapéutica y Vacunación en el Tracto Genital Inferior, entre octubre del 2013 y junio del 2019. Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital y todas las pacientes dieron su consentimiento informado. La población estudiada se clasificó en los siguientes grupos, que, a su vez se subdividieron en subgrupos: grupo 1: incluía a pacientes de 18 a 24 años sin lesión por VPH, con LSIL y HSIL; y grupo 2: pacientes de 25 a 50 años sin lesión por VPH, con LSIL y HSIL.

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 en tratamiento con corticoides o quimioterapia, sin inicio de relaciones sexuales o sin abstinencia sexual dentro de las 48 hs previas al estudio.

En el Programa de Prevención, Diagnóstico, Terapéutica y Vacunación en el Tracto Genital Inferior, previa firma del consentimiento informado, se recabaron los datos para completar la his-

Figura 5. Estado Vaginal Básico V (vaginitis microbiana inespecífica): morfotipos bacterianos corineformes. Observación del contenido vaginal en la coloración de Gram (1000X).

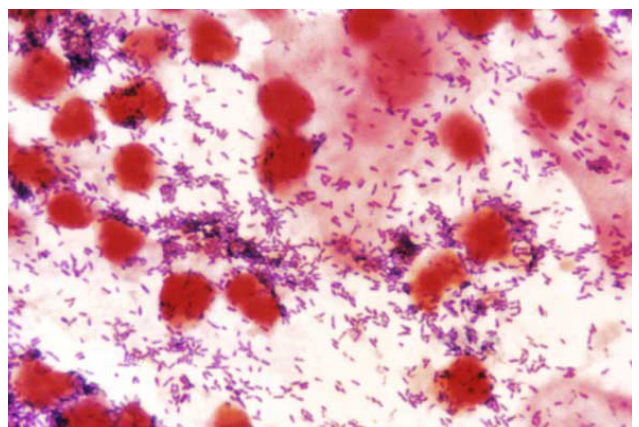


Tabla I. Distribución de los estados vaginales básicos (EVB) en el grupo 1 de pacientes entre 18-24 años.

| EVB | LSIL (n=30) | | HSIL (n=12) | | Carcinoma (n=1) | | Control (n=132) | |
|-------|----------------|------|----------------|------|--------------------|-----|--------------------|------|
| | N | % | n | % | n | % | n | % |
| I | 7 | 23,4 | 2 | 16,7 | 0 | 0 | 49 | 37,1 |
| II | 6 | 20,0 | 2 | 16,7 | 0 | 0 | 33 | 25,0 |
| III | 3 | 10,0 | 1 | 8,3 | 0 | 0 | 3 | 2,3 |
| IV | 10 | 33,3 | 1 | 8,3 | 1 | 100 | 22 | 16,7 |
| V | 4 | 13,3 | 6 | 50,0 | 0 | 0 | 25 | 19,0 |
| Total | 30 | 100 | 12 | 100 | 1 | 100 | 132 | 100 |

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL, lesión intraepitelial escamosa de alto grado; EVB, Estado Vaginal Básico.

toria clínica ginecológica. Además, se recogieron datos médicos y epidemiológicos de interés. Se tomó muestra para citología cervical, exo y endocervical (con espátula de Ayre y citobrush).

Se realizó colposcopia a todas las pacientes con un aumento de 16X, previa aplicación de un spray de ácido acético sobre el cuello uterino. Los datos recabados de la colposcopia fueron catalogados de acuerdo con la clasificación de la International Federation of Colposcopy and Cervical Pathology (versión 2011) [15].

Las citologías fueron coloreadas con la técnica de Papanicolaou (en el Departamento de Patología), la cual se informó, según la clasificación de Bethesda (versión 2001) [16]. Las muestras histológicas fueron informadas de acuerdo con la clasificación propuesta por el LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology*) Project [17].

A todas las pacientes se les realizó examen clínico y toma de fondo de saco vaginal, para el estudio microbiológico, por metodología convencional y estudio de los EVB mediante BACOVA. El estudio microbiológico del contenido vaginal incluyó los siguientes exámenes:

1. Extendidos para coloración de Gram y May-Grunwald Giemsa prolongado.
2. Observación en fresco con 1 ml de solución fisiológica (SF).
3. Determinación de pH de la secreción vaginal.
4. Observación en fresco con 1 ml de KOH al 10 % y prueba de aminas.
5. Cultivo en medio líquido (tioglicolato modificado) para *T. vaginalis*, con incubación de 7 días a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂ [18].
6. Cultivo en agar base Columbia con 5% de sangre humana y en agar Man Rogosa con incubación de 48 hs. a 37°C en atmósfera de 5 % de CO₂, conservando la muestra en medio de Stuart.

La detección de candidiasis se realizó a través de la observación en fresco con SF y con KOH al 10 % 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 (SF), la coloración de May-Grunwald Giemsa prolongado y el cultivo en tioglicolato modificado [18,19]. El diagnóstico de VB se realizó

Tabla II. Prevalencia de estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en el grupo 1 de pacientes 18 - 24 años, según tipo de lesión.

| EVB | LSIL (n=46) | | HSIL (n=37) | | Carcinoma (n=4) | | Control (n=498) | |
|-------|----------------|------|----------------|------|--------------------|------|--------------------|------|
| | N | % | n | % | n | % | n | % |
| I | 14 | 30,4 | 7 | 18,9 | 1 | 25,0 | 170 | 34,1 |
| II | 9 | 19,6 | 12 | 32,5 | 1 | 25,0 | 132 | 26,5 |
| III | 1 | 2,1 | 1 | 2,7 | 0 | 0 | 19 | 3,8 |
| IV | 9 | 19,6 | 8 | 21,6 | 1 | 25,0 | 86 | 17,3 |
| V | 13 | 28,3 | 9 | 24,3 | 1 | 25,0 | 91 | 18,3 |
| Total | 46 | 100 | 37 | 100 | 4 | 100 | 498 | 100 |

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL, lesión intraepitelial escamosa de alto grado; EVB, Estado Vaginal Básico.

Tabla III. Distribución de los estados vaginales básicos (EVB) en el grupo de pacientes entre 25 - 50 años.

| EVB | LSIL (n=30) | | HSIL (n=12) | | Carcinoma (n=1) | | Control (n=132) | |
|---|----------------|------|----------------|------|--------------------|-------|--------------------|------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Desbalance del contenido vaginal (III - IV - V) | 17 | 56,7 | 8 | 66,7 | 1 | 100,0 | 50 | 37,9 |
| Microbiota normal (I - II) | 13 | 43,3 | 4 | 33,3 | 0 | 0 | 82 | 62,1 |
| Total | 30 | 100 | 12 | 100 | 1 | 100 | 132 | 100 |

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL, lesión intraepitelial escamosa de alto grado; EVB, Estado Vaginal Básico.

utilizando el criterio de Nugent [20]. El estudio del BACOVA incluyó el análisis morfológico del contenido vaginal en función de la relación del valor numérico y la reacción inflamatoria vaginal y se identificaron 5 EVB: microbiota normal (I), microbiota normal más reacción inflamatoria (II), microbiota intermedia (III), VB (IV) y vaginitis microbiana inespecífica (V) (Figuras 1 a 5) [21]. El valor numérico se determinó evaluando los diferentes morfotipos en la coloración de Gram, según el criterio de Nugent [20]. La cuantificación de leucocitos se evaluó mediante tinción de May-Grunwald Giemsa y se expresó como número de leucocitos por campo (400X), calculando el recuento medio de leucocitos dentro de 10 campos microscópicos no adyacentes [21].

Para el aislamiento de las distintas especies de *Lactobacillus* se utilizó el agar sangre y el agar Man Rogosa y la identificación se realizó mediante pruebas convencionales basadas en la fermentación de hidratos de carbono [22], mediante Espectrometría de Masa BDTM Bruker MALDI-TOF (Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz, con detector de iones por Tiempo de Vuelo), utilizando una base de datos que incluyó más de 90 es-

pecies de lactobacilos, considerando un score $\geq 1,7$ para nivel de especie [23] y mediante secuenciación del gen ADNr 16S (método de referencia) [24].

Análisis estadístico

Para comparar las prevalencias de los EVB y de las especies de lactobacilos, de candidiasis, VB y trichomoniasis en los distintos grupos etarios y subgrupos, atendiendo a la lesión intraepitelial que la paciente presentaba, se utilizó el test de Chi cuadrado (χ^2) y el test de Fisher. Se consideró significativo un valor de p menor a 0,05.

Resultados

Se estudiaron 760 pacientes y se dividieron en 2 grupos etarios, grupo 1 de 18 a 24 años (Media: 21,5; IC95% 21,1-21,8; n=174) y el grupo 2 de 25 a 50 años (Media: 35,0; IC95% 34,4-35,6; n=585).

En la tabla I se observa la distribución de los EVB en el grupo 1. Las prevalencias de EVB de desbalance del contenido vaginal

Tabla IV. Prevalencia de los estados vaginales básicos (EVB) de desbalance del contenido vaginal en pacientes entre 25 - 50 años, según tipo de lesión.

| EVB | LSIL (n=46) | | HSIL (n=37) | | Carcinoma (n=4) | | Control (n=498) | |
|---|----------------|------|----------------|------|--------------------|------|--------------------|------|
| | N | % | n | % | n | % | n | % |
| Desbalance del contenido vaginal (III - IV - V) | 23 | 50,0 | 18 | 48,6 | 2 | 50,0 | 196 | 39,4 |
| Microbiota normal (I - II) | 23 | 50,0 | 19 | 51,4 | 2 | 50,0 | 302 | 60,6 |
| Total | 46 | 100 | 37 | 100 | 4 | 100 | 498 | 100 |

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL, lesión intraepitelial escamosa de alto grado; EVB, Estado Vaginal Básico.

Tabla V. Prevalencia de levaduras, vaginosis bacteriana y trichomonas en pacientes entre 18 - 24 años, según tipo de lesión.

| Patógeno | LSIL (n=30) | | HSIL (n=12) | | Carcinoma (n=1) | | Control (n=132) | |
|-------------|----------------|------|----------------|------|--------------------|-------|--------------------|------|
| | N | % | n | % | n | % | n | % |
| Levaduras | 5 | 16,7 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 34 | 25,8 |
| VB | 14 | 46,7 | 7 | 58,3 | 1 | 100,0 | 47 | 35,6 |
| Trichomonas | 1 | 3,3 | 1 | 8,3 | 0 | 0,0 | 4 | 3,0 |

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL, lesión intraepitelial escamosa de alto grado; VB, vaginosis bacteriana.

(III, IV y V) en el grupo 1 fue la siguiente: subgrupo control: 37,9% (50/132), subgrupo LSIL: 56,7% (17/30, p=0,047) y subgrupo HSIL 66,7% (8/12, p=0,05) [Tabla II].

En la tabla III se observa la distribución de los EVB en el grupo 1 según la lesión y el grupo control, se observa en la tabla III. Las prevalencias de EVB de desbalance del contenido vaginal (III, IV y V) en el grupo 2 fueron en el subgrupo control, 39,4% (196/498), subgrupo LSIL 50,0% (23/46, p=0,21) y subgrupo HSIL 48,6% (18/37, p=0,17) [Tabla IV]. Tanto el grupo 1 como el grupo 2 presentaron mayores prevalencias de VB (51,2% y 46,0%) vaginosis por levaduras (11,6% y 16,1%) y de *Trichomonas vaginalis* (4,7% y 4,6%) respectivamente, y estas diferencias resultaron estadísticamente significativas para ambos grupos etarios (p<0,001).

El análisis de prevalencia de VB en el grupo 1 fue: control 35,6%; LSIL 46,7%, HSIL 58,3%, mientras que en el grupo 2: control 32,5%; LSIL 47,8%, HSIL 43,2% [Tablas V y VI].

Del total de pacientes del estudio (n=760), se detectó mi-

crobiota lactobacilar en 465 pacientes (grupo 1 n=104 y grupo 2 n=361), de las cuales se pudieron caracterizar 270 especies de *Lactobacillus* cultivables. En la figura 6 se visualiza la morfología de *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri*, en la coloración de Gram. La frecuencia de las diferentes especies de *Lactobacillus* encontradas en las pacientes del estudio, según el tipo de lesión por VPH, se observa en la tabla VII. Cuando se realizó la caracterización de las especies de *Lactobacillus*, las pacientes con HSIL presentaron una prevalencia de 21,4% de *L. crispatus* y 46,2% de *L. jensenii*.

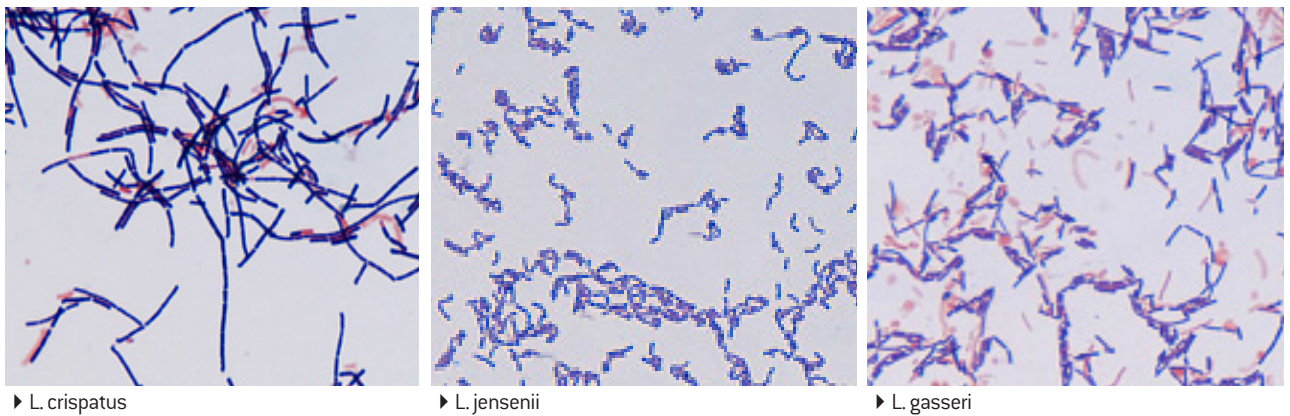
Discusión

Muchos factores se encuentran implicados en el desarrollo de carcinoma cervical; uno de ellos es el microbioma que acompaña la infección por VPH. La composición de la microbiota vaginal también es influenciada por numerosos factores; la etnia es el principal factor intrínseco que se asocia con la composición del microbioma, de forma tal que las mujeres caucásicas y asiá-

Tabla VI. Prevalencia de levaduras, vaginosis bacteriana y trichomonas en pacientes entre 25 - 50 años, según tipo de lesión.

| Patógeno | LSIL ^a (n=46) | | HSIL ^b (n=37) | | Carcinoma (n=4) | | Control (n=498) | |
|-----------------|-----------------------------|------|-----------------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|
| | N | % | n | % | n | % | n | % |
| Levaduras | 9 | 19,6 | 5 | 13,5 | 0 | 0,0 | 121 | 24,3 |
| VB ^c | 22 | 47,8 | 16 | 43,2 | 2 | 50,0 | 162 | 32,5 |
| Trichomonas | 4 | 8,7 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 15 | 3,0 |

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL, lesión intraepitelial escamosa de alto grado; VB, vaginosis bacteriana.

Figura 6. Morfología de *Lactobacillus* spp. en observación en la coloración de Gram (1000X).

ticas muestran mayor prevalencia de colonización por *Lactobacillus* spp. que las hispánicas y de raza negra [24, 25].

El desbalance de la microbiota vaginal se reconoce cada vez más como un impulsor del desarrollo oncogénico en los seres humanos, a través de una variedad de mecanismos que incluyen la falla de la barrera mucosa y la inflamación. La inflamación crónica de la mucosa también se considera fundamental para la carcinogénesis inducida por VPH. Al menos hipotéticamente, esto puede coincidir con las numerosas firmas moleculares de la inflamación de la mucosa de pacientes infectadas por VPH.

El cáncer cervical es una enfermedad de larga data y existen etapas previas a ella durante las cuales las condiciones del entorno cervical y vaginal se modifican, como la acidez vaginal y el patrón de citoquinas que conducen a un estado de inmunosupresión local. Por ejemplo, la infección por *Fusobacterium* spp. podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de un microambiente inmunosupresor caracterizado por citoquinas antiinflamatorias (perfil de citoquinas Th2), como IL-4 y TGF- β 1, en células del cuello uterino transformadas por VPH [26].

En el cáncer cervical la presencia de citoquinas inmunosupresoras (TGF- β 1, IL-4, IL-10) favorece la persistencia de la infección por VPH [27]. Adicionalmente, se ha propuesto que el microambiente vaginal y el perfil de citoquinas juegan un rol en la generación de la displasia cervical [28]. Asimismo, también se debe considerar la causa inversa, porque VPH también puede promover el desarrollo del desbalance vaginal y muestra una serie de mecanismos de silenciamiento y evasión inmunitaria. Audirac y col. [26] demostraron por metagenómica que el microbioma vaginal es notablemente diferente en cada una de las etapas de la infección por VPH. Las pacientes con carcinoma cervical mostraron mayor predominio de microbiota anaerobia en comparación con los controles VPH negativos, quienes presentaron mayor predominio de microbiota lactobacilar.

En nuestro estudio, las pacientes con HSIL presentaron una elevada prevalencia de VB; en el grupo 1 de 58,3 % y en el grupo 2 de 43,2 %. Resultados similares fueron descritos por Gillet y col. [10], quienes demostraron que la prevalencia de SIL fue superior en las pacientes que presentaron BV e indicaron que la presencia de VB incrementa el riesgo de HSIL a 1,51 [IC95%

1,24-1,83 $p < 0,05$], indicando una asociación positiva entre las dos condiciones.

Se conoce que la proteína E5 es fundamental para la replicación del VPH, sin embargo, esta molécula es muy sensible a los cambios de pH. En un medio ambiente de pH bajo promovido por el ácido láctico, puede considerarse fundamentalmente protector. El ácido láctico es un compuesto quiral con un isómero D, producido predominantemente por *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri* y otro isómero L, producido por *L. iners*, el epitelio vaginal *per se* y bacterias anaerobias responsables de la vaginosis. El isómero D producido por *L. crispatus* aumenta la viscosidad del moco cervical, lo cual es un factor de protección adicional [25]. En nuestro estudio, el subgrupo HSIL presentó menor prevalencia de *L. crispatus* respecto del control, en coincidencia con lo descrito por Gao y col. [5] para la población asiática y por Dareng y col. [29] para la población africana.

En nuestro trabajo, encontramos en el HSIL una disminución de la prevalencia de *L. crispatus* (21,4 %) y una alta prevalencia de *L. jensenii* (46,2 %), lo cual predispondría a estas pacientes a la disfunción vaginal. Estos resultados se corresponden con los descritos por Clarke y col. [30], quienes relataron que la elevación del pH se asociaba con un mayor riesgo de infección por VPH, dado que se observó que *L. crispatus* es capaz de acidificar el medio vaginal a pH menor de 4,0, mientras que otros, como *L. gasseri*, alcanzan un pH más elevado que oscila entre 4,4 y 5,0 [31].

Como conclusión, se observó mayor desbalance de la microbiota vaginal en las pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas que en los controles en ambos grupos etarios estudiados, especialmente, en el grupo de HSIL, donde se encontró una baja prevalencia de *L. crispatus* (especie protectora) y un incremento de *L. jensenii*, especie que posee un menor rol protector de la disfunción vaginal. Por lo tanto, es importante caracterizar las especies de *Lactobacillus*, dado que el incremento de especies no protectoras, en concordancia con el incremento de VB en este grupo de pacientes, alteran el microambiente vaginal y actúan como potenciales cofactores en la persistencia de una infección por VPH e incrementan el riesgo de adquirir otras infecciones de transmisión sexual.

Tabla VII. Distribución de las diferentes especies de *Lactobacillus* en las pacientes del estudio, según tipo de lesión VPH relacionada.

| Especies | LSIL (n=23) | HSIL (n=13) | Carcinoma (n=1) | Control (n=233) |
|-----------------------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|
| <i>L. crispatus</i> (n=87) | 12 | 3 | 0 | 72 |
| <i>L. gasseri</i> (n=88) | 6 | 1 | 1 | 80 |
| <i>L. jensenii</i> (n=74) | 4 | 6 | 0 | 64 |
| <i>L. iners</i> (n=11) | 0 | 2 | 0 | 9 |
| <i>L. vaginalis</i> (n=5) | 0 | 1 | 0 | 4 |
| <i>L. salivarius</i> (n=2) | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>L. fermentum</i> (n=1) | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. acidophilus</i> (n=1) | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>L. paracasei</i> (n=1) | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Total | 23 | 13 | 1 | 233 |

► LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL, lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

Referencias bibliográficas

- [1]. Petricevic L, Domig K, Niersche FJ, Iris Janitschek KC, Kneifel W, Kiss H. Characterization of the oral, vaginal and rectal *Lactobacillus* flora in healthy pregnant and postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 160: 93–9.
- [2]. Cauci S, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Iannicelli T, Lanzafame P *et al.* Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2147–52.
- [3]. Lamont, R., Sobel, J., Akins, R., Hassan, S., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J. *et al.* The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG* 2011; 118: 533- 49
- [4]. Behbakht K, Friedman J, Heimler I, Aroutcheva A, Simoes J, Faro S. Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: A case-control study. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2002; 10:181–6.
- [5]. 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. doi: 10.1186/1471-2334-13-271.
- [6]. Champer M, Wong AM, Champer J, Brito IL, Messer PW, Hou JY, Wright JD. The role of the vaginal microbiome in gynaecological cancer. *BJOG* 2018 Feb;125:309-15. doi: 10.1111/1471-0528.14631.
- [7]. Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 289: 715-23. doi: 10.1007/s00404-013-3122-3.
- [8]. 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: 674.e1-9. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.026.
- [9]. Seo SS, Oh HY, Lee JK, Kong JS, Lee DO, Kim MKI. Combined effect of diet and cervical microbiome on the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Nutr* 2016; 35: 1434-41. doi: 10.1016/j.clnu.2016.03.019.
- [10]. 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. doi: 10.1186/1471
- [11]. Guo YL, You K, Qiao J, Zhao YM, Geng L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *Int J STD AIDS* 2012; 23:581–4.
- [12]. Vriend HJ, Bogaards JA, van Bergen JE, Brink AA, van den Broek IV, Hoebe CJ, *et al.* Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young women with or without Chlamydia trachomatis coinfection. *Cancer Med* 2015; 4:1589-98.
- [13]. Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, Burguete-García AI, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zara-

- goza O, *et al.* Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J Clinical Oncology* 2014; 5:753–63
- [14]. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14: 717-34. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.101
- [15]. Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, *et al.* 2011 colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol* 2012 Jul;120(1):166-72.
- [16]. Solomon D, Nayar R. El sistema Bethesda para informar citología cervical. 1º ed. Buenos Aires; Ediciones Journal; 2005
- [17]. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, *et al*; Members of LAST Project Work Groups. 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. *Arch Pathol Lab Med* 2012 Oct;136(10):1266-97.
- [18]. Poch F, Levin D, Levin S, Dan M. Modified thioglycolate medium: a simple and reliable means for detection of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2630-1.
- [19]. Perazzi B, Menghi C, Coppolillo E, Gatta C, Cora Eliseth M, de Torres RA *et al.* Prevalence and comparison of diagnostic methods for *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Argentina. *Korean J Parasitol* 2010; 1: 61-5.
- [20]. 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: 279-301.
- [21]. Proyecto BACOVA, Programa PROSAR, Fundación Bioquímica Argentina. Manual de Procedimientos BACOVA 2018. Disponible en: <http://www.fba.org.ar/PROSAR>
- [22]. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th edition. Washington DC, ASM Press, 2015.
- [23]. Karas M, Krger R. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chemical Reviews* 2003; 103: 427440. Doi: 10.1021/cr010376a.
- [24]. Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, SO JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, *et al.* Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol* 2002; 92:451-9.
- [25]. 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 1; 4:58.
- [26]. Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Téllez-Sosa J, MartínezBarnetche J, Cortina-Ceballos B, *et al.* Cervical microbiome and cytokine profile at various stages of cervical cancer: A Pilot study. *PLoS ONE* (2016) 1: e0153274. doi:10.1371/journal.pone.0153274
- [27]. Bermúdez-Morales VH, Burguete AI, Gutierrez ML, Alcocer-González JM, Madrid-Marina V. Correlation between IL-10 expression and Human Papillomavirus infection in cervical cancer. A mechanism for immune response escape. *Cancer Investig* 2008; 26:1037–43.
- [28]. Behbakht K, Friedman J, Heimler I, Aroutcheva A, Simoes J, Faro S. Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: A case-control study. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2002; 10:181–6.
- [29]. Dareng EO, Ma B, Famooto AO, Akarolo-Anthony SN, Offiong RA, Olaniyan O, *et al.* Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women. *Epidemiol Infect* 2016; 144: 123-37
- [30]. 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. doi: 10.1186/1471-2334-12-33.
- [31]. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 Suppl 1:4680-7.