

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MARIA THALILLIAN SANTOS FIGUEIREDO

**MICROBIOTA CERVICOVAGINAL COMO BIOMARCADOR PREDITIVO DE
CÂNCER CERVICAL: META-ANÁLISE INTEGRATIVA COM APRENDIZADO DE
MÁQUINA**

DOIS VIZINHOS

2025

MARIA THALILLIAN SANTOS FIGUEIREDO

**MICROBIOTA CERVICOVAGINAL COMO BIOMARCADOR PREDITIVO DE
CÂNCER CERVICAL: META-ANÁLISE INTEGRATIVA COM APRENDIZADO DE
MÁQUINA**

**Cervicovaginal Microbiota as a Predictive Biomarker for Cervical Cancer: Integrative
Meta-Analysis with Machine Learning**

**Trabalho de conclusão de curso de
Especialização apresentado como requisito
para obtenção do título de Especialista em
Biologia Molecular – Habilitação
Bioinformática da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).**

**Orientador(a): Deborah Catharine de Assis
Leite.**

Coorientador(a): Paola Gyuliane Gonçalves

DOIS VIZINHOS

2025



Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

MARIA THALILLIAN SANTOS FIGUEIREDO

**MICROBIOTA CERVICOVAGINAL COMO BIOMARCADOR PREDITIVO DE
CÂNCER CERVICAL: META-ANÁLISE INTEGRATIVA COM APRENDIZADO DE
MÁQUINA**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Especialização apresentado como requisito para
obtenção do título de Especialista em Biologia
Molecular – Habilitação Bioinformática da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 16/06/2025

Deborah Catharine de Assis Leite
Doutorado em Ciências (Microbiologia)
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Dois Vizinhos

Alex Batista Trentin
Mestrado em Biotecnologia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Dois Vizinhos

Guilherme Ferrari Bevilacqua
Mestrado em Ciências
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP)

DOIS VIZINHOS

2025

Dedico à minha mãe pelo empenho que já teve - e têm ainda - em me ensinar a colocar a educação em primeiro lugar e ao meu pai (*in memoriam*) por tudo que fez por mim em vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me guiado durante essa trajetória.

À minha orientadora Dr^a Deborah Catharine de Assis Leite e coorientadora Paola Gyuliane Gonçalves pelos ensinamentos que me formaram nessa jornada acadêmica, pelo apoio, por todo conhecimento adquirido em minha formação.

À minha mãe Maria Neuma por todo incentivo em investir nos estudos.

Ao meu cônjuge Katson Barreto por todo companheirismo, ajuda e incentivo.

A todos os docentes da Especialização em Biologia Molecular – Habilitação Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) que foram de grande importância na minha formação.

**“A ciência e a vida cotidiana não pode e não
devem ser separadas.”
(Rosalind Franklin)**

RESUMO

O câncer do colo do útero (CC) é uma das principais causas de mortalidade feminina em países em desenvolvimento. Embora a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) seja o principal fator etiológico, evidências crescentes indicam que alterações na microbiota cervicovaginal também desempenham um papel importante na progressão da doença. Este estudo teve como objetivo investigar variações na composição e diversidade microbiana ao longo dos estágios da carcinogênese cervical, buscando identificar potenciais biomarcadores bacterianos para diagnóstico precoce e predição de risco. Foram analisadas 1.008 amostras cervicais e vaginais obtidas de bancos públicos (ENA e NCBI), distribuídas em quatro grupos clínicos: controle saudável (n = 441), lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL, n = 112), lesão de alto grau (HSIL, n = 170) e câncer cervical (n = 285), abrangendo populações de cinco continentes. As sequências do gene 16S rRNA foram processadas com QIIME 2 e analisadas quanto à diversidade alfa e beta, composição taxonômica e poder discriminativo por meio de algoritmos de aprendizado de máquina (machine-learning). A análise de alfa-diversidade, baseada no índice de Shannon, demonstrou maior diversidade no grupo câncer. A beta-diversidade, avaliada por NMDS, indicou diferenças composicionais marcantes entre os grupos, especialmente no grupo câncer, que apresentou maior dispersão microbiana. Em termos taxonômicos, controles saudáveis apresentaram predominância de Firmicutes e da família Lactobacillaceae, enquanto os grupos com lesões e câncer exibiram maior abundância relativa de Bacteroidota, Fusobacteriota e Proteobacteria, com destaque para as famílias Peptostreptococcaceae, Prevotellaceae, Fusobacteriaceae e Enterobacteriaceae. Além disso, foi avaliada a relação entre microbiota e status de infecção por HPV. A abundância de *Gardnerella* não diferiu significativamente entre mulheres HPV-positivas e negativas (p = 0,385). No entanto, *Faecalibacterium* foi mais prevalente em mulheres HPV-negativas, enquanto o grupo *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* mostrou-se mais abundante em mulheres HPV-positivas, sugerindo seu potencial como biomarcadores associados à presença ou ausência do vírus. A análise discriminante (LDA) identificou microrganismos característicos para cada grupo: *Lactobacillus* no grupo controle; *Gardnerella* e *Streptococcus* em LSIL; *Sneathia* e *L. iners* em HSIL; e *Fusobacterium*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus* e *Enterococcus* no grupo câncer. O modelo de machine learning (Random Forest) alcançou alta acurácia na distinção entre câncer e controles (AUC = 0,96 e 0,86), mas menor desempenho nas categorias intermediárias (LSIL e HSIL), indicando a necessidade de modelos mais robustos. A identificação e validação de biomarcadores microbianos poderá viabilizar estratégias não invasivas de triagem e diagnóstico precoce do câncer cervical, contribuindo para um melhor prognóstico e aumento da sobrevida das pacientes.

Palavras-chave: Microbiota cervicovaginal; Câncer cervical; HPV; Disbiose cervicovaginal.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is one of the leading causes of female mortality in developing countries. Although persistent infection with human papillomavirus (HPV) is the main etiological factor, growing evidence indicates that alterations in the cervicovaginal microbiota also play an important role in disease progression. This study aimed to investigate variations in microbial composition and diversity across different stages of cervical carcinogenesis, seeking to identify potential bacterial biomarkers for early diagnosis and risk prediction. A total of 1,008 cervical and vaginal samples obtained from public databases (ENA and NCBI) were analyzed, distributed across four clinical groups: healthy controls (n = 441), low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL, n = 112), high-grade lesions (HSIL, n = 170), and cervical cancer (n = 285), covering populations from five continents. 16S rRNA gene sequences were processed using QIIME 2 and analyzed for alpha and beta diversity, taxonomic composition, and discriminative power through machine learning algorithms. Alpha diversity analysis, based on the Shannon index, showed higher diversity in the cancer group. Beta diversity, evaluated using NMDS, indicated marked compositional differences between groups, especially in the cancer group, which exhibited greater microbial dispersion. Taxonomically, healthy controls showed predominance of Firmicutes and the Lactobacillaceae family, while lesion and cancer groups exhibited a higher relative abundance of Bacteroidota, Fusobacteriota, and Proteobacteria, with emphasis on the families Peptostreptococcaceae, Prevotellaceae, Fusobacteriaceae, and Enterobacteriaceae. Additionally, the relationship between microbiota and HPV infection status was evaluated. The abundance of *Gardnerella* did not differ significantly between HPV-positive and HPV-negative women ($p = 0.385$). However, *Faecalibacterium* was more prevalent in HPV-negative women, while the *Burkholderia*-*Caballeronia*-*Paraburkholderia* group was more abundant in HPV-positive women, suggesting their potential as biomarkers associated with the presence or absence of the virus. Discriminant analysis (LDA) identified characteristic microorganisms for each group: *Lactobacillus* in the control group; *Gardnerella* and *Streptococcus* in LSIL; *Sneathia* and *L. iners* in HSIL; and *Fusobacterium*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, and *Enterococcus* in the cancer group. Machine learning model (Random Forest) achieved high accuracy in distinguishing cancer from controls (AUC = 0.96 and 0.86), but lower performance in the intermediate categories (LSIL and HSIL), indicating the need for more robust models. The identification and validation of microbial biomarkers may enable non-invasive strategies for screening and early diagnosis of cervical cancer, contributing to better prognosis and increased patient survival.

Keywords: Cervicovaginal microbiota; Cervical cancer; HPV; Cervicovaginal dysbiosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC: Câncer Cervical

HPV: Papilomavírus humano

HSIL: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

LSIL: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

NIC 2 +: Neoplasia intraepitelial cervical de alto grau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Aspectos epidemiológicos e fatores etiopatogênicos do câncer do colo do útero.....	14
3.1.1 Lesões Intraepiteliais Escamosas: LSIL e HSIL	16
3.2 Microbiota Cervicovaginal.....	16
3.3 α-diversidade e β-diversidade	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
5 RESULTADOS & DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Incidência de casos de câncer do colo do útero em 2022.....	14
Figura 2- Mortalidade de casos de câncer do colo do útero em 2022.....	15
Figura 3 . Composição da microbiota e outras características do microambiente local associadas à saúde e cânceres ginecológicos em todo o trato reprodutivo feminino (TRF).....	18
Figura 4. α -diversidade e β -diversidade.....	19
Figura 5 - Alfa-diversidade dos grupos controle, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical, de acordo com o índice de Shannon.....	23
Figura 6- Abundância relativa da microbiota nos grupos controle, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical, classificados de acordo com o filo (A), família (B) e gênero (C).....	25
Figura 7- Distribuição dos principais filos bacterianos na microbiota cervicovaginal em diferentes países de origem.....	27
Figura 8 - Alfa-diversidade entre grupos HPV-negativo e positivo (A) Boxplot da abundância logarítmica de <i>Gardnerella</i> entre grupos HPV-negativo e HPV-positivo (B).....	28
Figura 9 - Análise de beta diversidade por NMDS dos grupos controle, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical.....	30
Figura 10- Heatmap mostrando as principais diferenças de abundância entre os grupos controle, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical.....	32
Figura 11-LDA <i>score</i> mostrando os organismos mais significativos nos grupos controle, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical, classificados de acordo com o nível taxonômico de gênero ou espécie ao qual pertencem.	33
Figura 12- Desempenho na Classificação de Amostras de Câncer, Controle e Lesões Cervicais: Matriz de Confusão (A) e Curvas ROC (B).....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Projetos selecionados para análise da microbiota cervical e vaginal com base em sequenciamento 16S rRNA.....20

Tabela 2- Diferença de abundância entre os controles com HPV negativo e positivo de acordo com os valores de EdgeR, sendo os valores positivos mais abundantes em HPV negativo e os negativos em HPV positivo.....29

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero (câncer cervical – CC) constitui um importante desafio à saúde pública global, sobretudo em países de baixa e média renda, onde a cobertura de rastreamento preventivo ainda é limitada. De acordo com os dados mais recentes do GLOBOCAN, o CC é o quarto tipo de câncer mais comum entre mulheres no mundo, sendo responsável por centenas de milhares de novos casos e mortes anualmente (Ferlay et al., 2024). A infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV), principalmente pelos tipos oncogênicos de alto risco, é reconhecida como a principal causa do desenvolvimento do CC (Pett, 2007). No entanto, a infecção por HPV, isoladamente, não é suficiente para levar à transformação maligna, uma vez que a maioria das mulheres infectadas elimina o vírus espontaneamente. Isso evidencia a influência de outros fatores moduladores na progressão da doença (Shulzhenko, 2014).

Nas últimas décadas, avanços nas tecnologias de sequenciamento de nova geração, como o sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal, viabilizaram o aprimoramento das análises e da compreensão da microbiota do trato genital feminino. Nesse contexto, o conceito de microbiota cervicovaginal passou a ocupar lugar de destaque nas pesquisas biomédicas, dada sua estreita relação com a saúde reprodutiva e ginecológica. A presença da microbiota dominada por bactérias do gênero *Lactobacillus*, por exemplo, está associada à manutenção de um ambiente ácido e protetor, dificultando a colonização por patógenos (Tachedjian, 2017). Por outro lado, alterações na composição microbiana, caracterizadas por perda de *Lactobacillus* e aumento de bactérias anaeróbias como *Gardnerella*, *Atopobium* e *Prevotella*, configuram um estado de disbiose, frequentemente associado a maior suscetibilidade a infecções, incluindo o HPV, e à persistência viral (Tyssen, 2018).

Estudos recentes vêm demonstrando que a microbiota local pode influenciar diretamente a resposta imune da mucosa cervical, a eficácia de tratamentos oncológicos e até mesmo o padrão de integração genômica do HPV (Li, 2022). Além disso, a diversidade e a estrutura das comunidades bacterianas variam significativamente entre diferentes grupos populacionais, refletindo fatores genéticos, epigenéticos, ambientais, comportamentais, socioeconômicos e culturais. A análise da diversidade microbiana, por meio de métricas como alfa-diversidade (diversidade intraindividual) e beta-diversidade (diversidade interindividual), tornou-se, assim, uma ferramenta valiosa na investigação de marcadores microbianos associados a desfechos clínicos (Xia et al., 2018).

Neste contexto, este trabalho propõe investigar a associação entre a microbiota cervicovaginal, o HPV e a progressão de lesões cervicais em diferentes populações, com o objetivo de identificar possíveis biomarcadores bacterianos que possam auxiliar no diagnóstico precoce do câncer cervical e de suas lesões precursoras, como as lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL). A infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV), especialmente pelos tipos oncogênicos de alto risco, é um fator necessário, mas não suficiente, para o desenvolvimento do câncer cervical, sendo a microbiota local um potencial modulador desse processo. A identificação de assinaturas microbianas específicas poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas mais sensíveis, não invasivas e adaptadas a diferentes contextos populacionais, promovendo uma abordagem personalizada na detecção e prevenção do câncer cervical. Além disso, compreender as variações na composição microbiana entre indivíduos saudáveis, pacientes com lesões cervicais e com câncer cervical pode lançar luz sobre mecanismos fisiopatológicos ainda pouco explorados, fortalecendo o papel da microbiota como um componente-chave na oncogênese e como alvo promissor em intervenções futuras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar biomarcadores bacterianos presentes no colo do útero associados a microbiota de pacientes com câncer cervical, lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL).

2.2 Objetivos Específicos

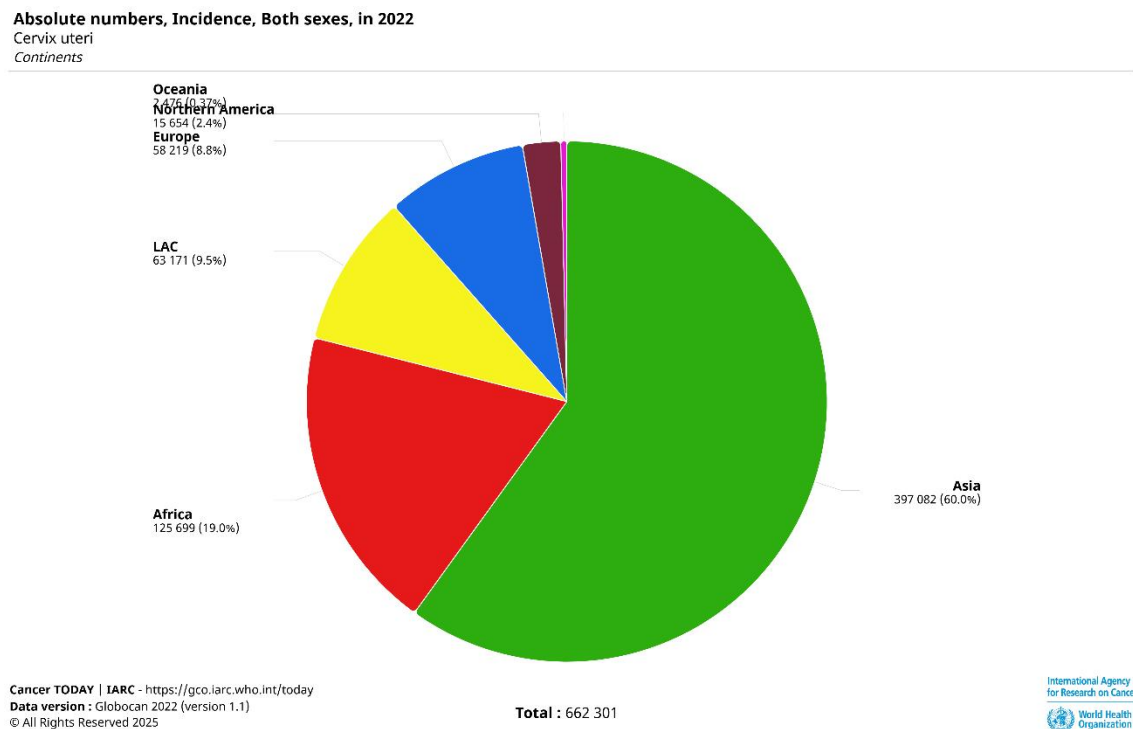
- a. Avaliar e comparar a diversidade alfa e beta da microbiota cervicovaginal entre os grupos: câncer cervical, lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão de alto grau (HSIL) e indivíduos saudáveis;
- b. Identificar bactérias diferencialmente abundantes associadas a cada condição clínica (câncer, LSIL e HSIL);
- c. Diferenciar o perfil de assinaturas bacterianas cervicais em diferentes populações;
- d. Comparar a composição microbiana de indivíduos controles com HPV negativo e positivo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos epidemiológicos e fatores etiopatogênicos do câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero (CC) é o quarto câncer mais comum em mulheres em todo o mundo, com uma estimativa de incidência de 662.301 casos (figura 1) e 348.874 mortes (figura 2), de acordo com o último relatório da Globocan.

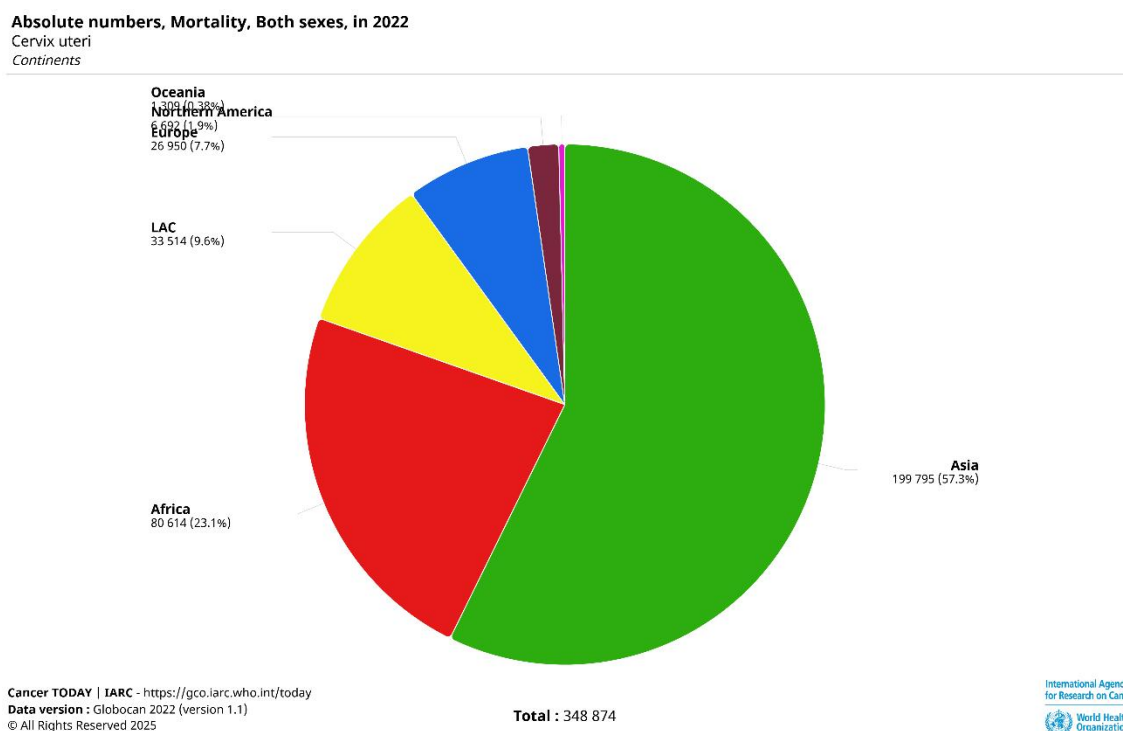
Figura 1- Incidência de casos de câncer do colo do útero em 2022.



Fonte: GLOBOCAN (2022)

Segundo dados do GLOBOCAN (2022), a Ásia concentra a maior carga global de casos de câncer do colo do útero, respondendo por 397.082 casos, o que representa 60% do total mundial. Em seguida, destaca-se o continente africano, com 125.699 casos, correspondendo a 19% da incidência global. A região da América Latina e Caribe (LAC) contribui com 63.171 casos (9,5%), enquanto a Europa apresenta 58.219 casos (8,8%). As menores proporções são observadas na América do Norte e na Oceania, com 2,4% e 0,37% dos casos, respectivamente. Esses dados reforçam a concentração da doença em regiões de médio e baixo desenvolvimento socioeconômico, refletindo desigualdades no acesso a estratégias de prevenção, como a vacinação contra o HPV, rastreamento sistemático e tratamento precoce. A elevada incidência na Ásia e África evidencia a urgência de políticas públicas globais voltadas à equidade em saúde e controle do câncer cervical.

Figura 2- Mortalidade de casos de câncer do colo do útero em 2022.



Fonte: GLOBOCAN (2022)

Assim como na incidência, a mortalidade por câncer do colo do útero está desigualmente distribuída entre os continentes (figura 2). A Ásia lidera em número absoluto de óbitos, com 199.795 mortes, representando 57,3% do total global. A África aparece em seguida com 80.614 mortes (23,1%), seguida pela região da América Latina e Caribe (LAC) com 33.514 óbitos (9,6%). A Europa responde por 26.950 mortes (7,7%), enquanto a América do Norte e a Oceania apresentam os menores números, com 1,9% e 0,38%, respectivamente (GLOBOCAN, 2022).

A integração do HPV é um fator molecular chave da carcinogênese cervical (Pett, 2007). Enquanto o DNA transitório do HPV permanece episômico, o DNA persistente do HPV geralmente se integra ao genoma do hospedeiro, aumentando o risco de lesões cervicais de alto grau e potencialmente levando à transformação maligna (Hausen, 2002; Moody, 2010). As taxas de integração aumentaram de 53,8% em pacientes com NIC (Hu, 2015; Huang, 2019) para 91,6% em pacientes com câncer cervical (Fan et al, 2023), variando entre HPV e subtipos patológicos (Fan et al., 2023; Bi et al., 2023; Vinokurova, 2008).

Inicialmente, a integração do HPV foi classificada em tipo 1 (genoma viral completo único) e tipo 2 (múltiplas repetições em tandem) (McBride, Warburton, 2017). Os avanços nas tecnologias de sequenciamento revelaram mais tipos de integração do HPV. O sequenciamento de leitura longa identificou conclusivamente quatro tipos de integração do HPV em casos de câncer do colo do útero, incluindo genomas de HPV truncados sem os genes *E6 / E7* (Zhou et al., 2022). Dados multiômicos e de célula única revelaram integração silenciosa e produtiva do HPV, contribuindo para a fisiopatologia do câncer do colo do útero (Bi et al., 2023).

A infecção pelo HPV, isoladamente, não é suficiente para causar o câncer do colo do útero (CCU). No entanto, quando essa infecção se torna persistente, há um risco maior de progressão das lesões cervicais até o desenvolvimento do câncer. Na maioria dos casos, o sistema imunológico é capaz de combater a infecção pelo HPV, evitando que a lesão evolua para um estágio mais grave. Apenas uma pequena parcela das mulheres infectadas não consegue eliminar o vírus e, conseqüentemente, desenvolve o CCU. Isso indica que outros fatores podem estar envolvidos na progressão ou regressão das lesões cervicais (Shulzhenko, 2014).

Entre os principais fatores de risco para esse tipo de câncer estão o início precoce da vida sexual, histórico de infecções sexualmente transmissíveis, múltiplos parceiros sexuais, uso prolongado de anticoncepcionais, tabagismo, número elevado de gestações e condições que comprometam a imunidade (Partridge et al., 2014).

3.1.1 Lesões Intraepiteliais Escamosas: LSIL e HSIL

Os laudos citopatológicos do sistema público utilizam a terminologia baseada no Sistema Bethesda, que classifica as alterações celulares do colo do útero, incluindo as lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e de alto grau (HSIL). A LSIL representa a manifestação citopatológica da infecção pelo papilomavírus humano (HPV), sendo caracterizada por alterações celulares que indicam infecção viral ativa, com grande potencial de regressão espontânea, principalmente em mulheres com menos de 30 anos (INCA, 2006; Alves, 2016; IARC, 2007). Embora a progressão de LSIL para câncer cervical seja incomum, essas lesões podem evoluir para alterações mais graves, especialmente em casos de persistência da infecção por HPV oncogênico (Katki, 2013).

A conduta inicial frente a um diagnóstico citopatológico de LSIL é o acompanhamento com repetição da citologia após seis meses. Se houver recorrência da lesão, é indicada a realização de colposcopia, e, na presença de achados anormais, deve-se proceder com biópsia para avaliação mais precisa (Ismael, 2019; Massad, 2013).

Por outro lado, a HSIL é considerada uma lesão precursora do câncer do colo do útero, pois apresenta alterações celulares significativas associadas à infecção persistente por tipos oncogênicos de HPV. Por esse motivo, a HSIL requer intervenção imediata, com colposcopia e biópsia obrigatórias em até três meses após o diagnóstico citopatológico (Nakagawa, 2010). Se não detectada ou tratada adequadamente, a HSIL pode evoluir para carcinoma invasivo ao longo dos anos (Leto, 2011).

3.2 Microbiota Cervicovaginal

O corpo humano é colonizado por uma comunidade diversificada de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos, que incluem bactérias, arqueias, fungos, protistas e vírus (Gilbert, 2018).

Nos últimos anos, os avanços na tecnologia de sequenciamento, especialmente o sequenciamento de RNA ribossômico 16S (16S rRNA), permitiram um melhor entendimento da microbiota cervicovaginal e sua relação com o câncer do colo do útero (CCU) (Njoku, 2020; Kyrgiou, 2017). Alterações no microbioma vaginal, como a redução de *Lactobacillus* e o aumento de bactérias anaeróbias (figura 3), têm sido associadas ao desenvolvimento do CCU e podem influenciar a resposta ao tratamento oncológico por diferentes mecanismos

(Zhu, 2017; Bhatt, 2017). Assim, a microbiota vaginal surge como um potencial alvo para otimizar a sensibilidade ao tratamento do CCU.

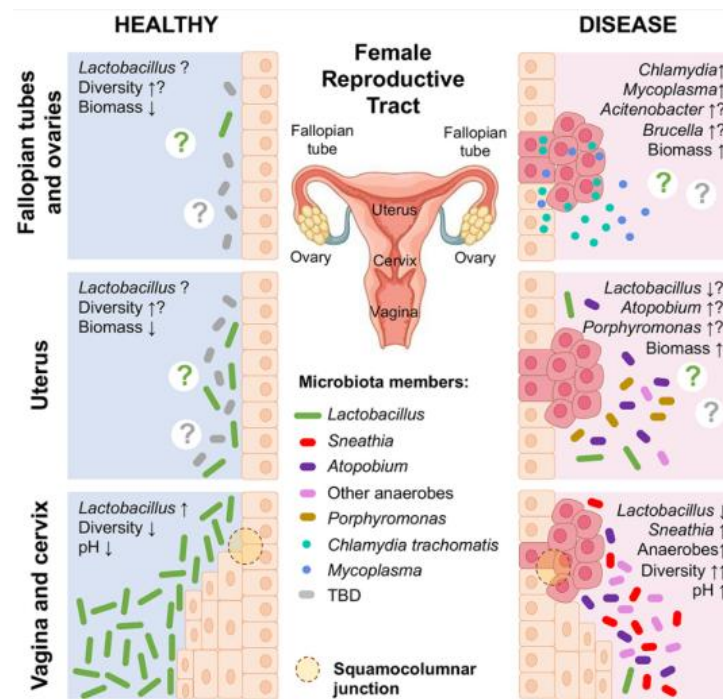
A microbiota cervicovaginal pode ser classificada em cinco tipos de estado comunitário (CSTs I-V), definidos pela presença predominante de certas bactérias (Ravel, 2011). Os CSTs I, II, III e V são dominados por espécies de *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*, respectivamente), enquanto o CST IV apresenta alta diversidade bacteriana e predominância de anaeróbios como *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Atopobium* e *Prevotella*, caracterizando um estado de disbiose (Ravel, 2011; Fettweis, 2014; Van de Wijgert, 2017). Algumas mulheres com disbiose desenvolvem sintomas como corrimento vaginal anormal, inflamação, odor e prurido, sendo diagnosticadas, nessas condições, com vaginose bacteriana (White, 2011; Ma, 2012). Embora algumas mulheres apresentem sintomas, grande parte delas são assintomáticas (Fettweis, 2014). No entanto, tanto sintomáticas quanto assintomáticas apresentam maior propensão a adquirir HIV, HPV e outras infecções (Van de Wijgert, 2017).

O gênero *Lactobacillus* apresenta alta abundância na microbiota cervicovaginal e foi descrito pela primeira vez em 1892 por Döderlein (Martin, 2012). Espécies como *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii* são capazes de produzir ácido lático e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), substâncias que inibem o crescimento de diversas bactérias e vírus (Tachedjian, 2017). A produção de ácido lático reduz o pH vaginal para valores abaixo de 4,5, criando um ambiente hostil a patógenos (Martin, 2016; Laniewski, 2018). Estudos *in vitro* demonstraram que o ácido lático inativa patógenos sexualmente transmissíveis, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, vírus herpes simplex e vírus da imunodeficiência humana (Graver, 2011; Gong, 2014; Conti, 2009; Tyssen, 2018). Além disso, *Lactobacillus spp.* bloqueiam a adesão de patógenos invasores ao epitélio vaginal por exclusão competitiva e produzem bacteriocinas, que inibem o crescimento de patógenos (Laniewski, 2018; Maldonado-Barragan, 2016). Em troca, esses microrganismos prosperam na vagina ao utilizarem subprodutos do glicogênio como fonte de energia (Mirmonsef, 2016).

Diversos fatores influenciam a composição do microbioma vaginal. Entre eles, estão aspectos comportamentais, como orientação e atividade sexual, número de parceiros, uso de contraceptivos, lubrificantes e brinquedos sexuais, hábitos de higiene íntima, tabagismo, consumo de álcool, dieta, obesidade e prática de exercícios físicos. Também há influências socioeconômicas, como nível educacional, renda, barreiras no acesso à saúde e impacto de desigualdades estruturais. Além disso, fatores genéticos e do próprio organismo, incluindo idade, perfil genético e epigenético, variações hormonais, gravidez e imunidade, exercem um papel significativo. Outras condições clínicas, como doenças cardiometabólicas, neuroendócrinas e inflamatórias, bem como fatores ambientais, como infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), vacinação contra o HPV, exposição a antibióticos, probióticos, toxinas, carcinógenos e estresse, também afetam essa microbiota. Além disso, eventos iniciais da vida, como tipo de parto e período neonatal, influenciam sua composição ao longo do tempo (Łaniewski, 2018; Hickey, 2012; Martin, 2016; Lewis, 2017; Gajer, 2012). Durante a puberdade, o aumento do estrogênio estimula a maturação e proliferação do epitélio vaginal, além do acúmulo de glicogênio (Amabebe, 2018). Esse glicogênio é degradado pela alfa-amilase e convertido em ácido lático por *Lactobacillus*, sendo que o ácido D-lático oferece maior proteção contra infecções (Aldunate, 2013). Diferente de outras espécies do gênero, *L. iners* possui um genoma reduzido e não consegue produzir ácido D-lático nem H_2O_2 (Petrova, 2017). Em vez disso, gera ácido L-lático, associado a maior susceptibilidade a infecções virais, e secreta inerolisina, uma toxina que compromete a integridade do epitélio vaginal,

semelhante à vaginolisina produzida por *Gardnerella* (Rampersaud, 2011; Macklaim, 2011; Petrova, 2017).

Figura 3 . Composição da microbiota e outras características do microambiente local associadas à saúde e cânceres ginecológicos em todo o trato reprodutivo feminino (TRF)



Fonte: Laniewski et al (2023)

3.3 α -diversidade e β -diversidade

A alfa-diversidade refere-se à diversidade dentro de uma única amostra, como amostras cervicais, de fluido de lavagem fecal, saliva ou líquido broncoalveolar (Gilbert & Lynch, 2019; Wang et al., 2019). Três índices de diversidade alfa são frequentemente utilizados em pesquisas médicas: o índice Chao1, o índice de Shannon-Wiener e o índice de Simpson. O índice Chao1, uma métrica de riqueza, estima o número total de espécies presentes em uma amostra. Essa estimativa baseia-se em três fatores: o número de espécies observadas, o número de táxons singletons (espécies representadas por apenas um indivíduo) e o número de táxons duplos (espécies representadas por dois indivíduos). Por esse motivo, o índice Chao1 não reflete a abundância relativa da microbiota, mas apenas sua riqueza estimada (Xia et al., 2018).

O índice de Shannon-Wiener combina riqueza e uniformidade (Borcard et al., 2018). Dá mais peso às espécies raras, o que significa que é maior quando o número de espécies raras aumenta. Seu valor geralmente não excede 5,0; quanto maior for o seu valor, mais abundante é a α -diversidade. O índice de Simpson também combina riqueza com uniformidade. No entanto, em contraste com o índice de Shannon-Wiener, ele coloca mais ênfase em espécies comuns. Seu valor varia de 0 a quase 1; quanto maior for o seu valor, mais abundante é a α -diversidade (Xia et al., 2018).

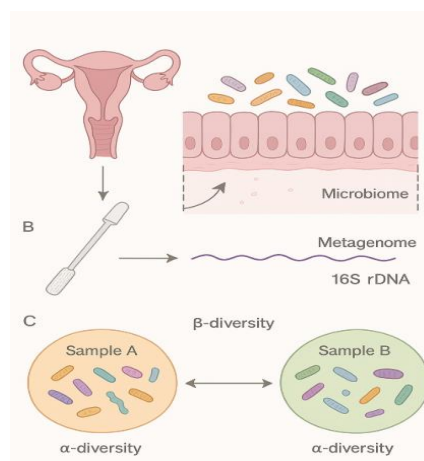
Nos índices acima, a riqueza refere-se ao número total de espécies em uma amostra, enquanto a abundância refere-se às contagens brutas de uma espécie. Observe que a

abundância relativa é usada quando as contagens de leitura bruta são normalizadas ou convertidas em porcentagens (Xia et al., 2018).

Beta diversidade refere-se às diferenças de microbiota entre amostras ou grupos (Gilbert, Lynch, 2019). É normalmente usado para entender se as diferenças nas composições da microbiota de dois grupos são significativas (Xia et al., 2018). Aqui, nos concentramos em dois índices de diversidade de β comumente usados: dissimilaridade de Bray-Curtis e distância UniFrac. A dissimilaridade de Bray-Curtis é uma medida estatística usada para quantificar a dissimilaridade composicional entre duas amostras ou grupos. Seu valor varia de 0 a 1, onde 0 significa que as duas amostras ou grupos compartilham todas as espécies e 1 significa que elas não compartilham nenhuma (Bray, Curtis, 1957). Além disso, dá mais peso às espécies comuns (Borcard et al., 2018). Observe que Bray-Curtis não é uma medida de distância real, então o termo "dissimilaridade de Bray-Curtis" é mais apropriado do que "distância de Bray-Curtis" (Xia et al., 2018). A distância UniFrac, que pode ser não ponderada ou ponderada, estima as diferenças entre amostras ou grupos com base na distância filogenética (Lozupone, Knight, 2005). A distância UniFrac não ponderada leva em consideração a presença e ausência de táxons. É sensível para detectar mudanças de riqueza em espécies raras, mas ignora as informações de abundância no cálculo (Chen et al., 2012). A distância UniFrac ponderada incorpora as informações de abundância (Lozupone et al., 2007) e reduz a contribuição de espécies raras (Xia et al., 2018).

A alfa-diversidade refere-se à diversidade de espécies dentro de uma única amostra, enquanto a β -diversidade descreve as diferenças na composição microbiana entre diferentes amostras ou grupos (Figura 4) (Gilbert & Lynch, 2019; Xia et al., 2018).

Figura 4. α -diversidade e β -diversidade



Fonte: Autoria própria (2025)

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os dados de sequenciamento brutos de amostras cervicais e vaginais de pacientes com câncer cervical e controles foram obtidos por meio do *European Nucleotide Archive* (ENA), disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/ena>, e do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Ambos são repositórios públicos que armazenam dados de sequenciamento e incluem estudos sobre microbiotas (Yuan et al., 2023).

Para a mineração de dados, foram incluídos estudos que disponibilizavam sequências da região 16S do rDNA bacteriano obtidas a partir de amostras cervicais e vaginais, processadas na plataforma Illumina, tanto no formato “paired-end” quanto “single-end”. Os critérios de inclusão englobaram estudos envolvendo casos de câncer cervical (CC) e lesões precursoras, como lesões de baixo grau (LSIL) e de alto grau (HSIL), conforme descrito nos metadados de cada pesquisa. Como critérios de exclusão, foram descartados estudos baseados em sequenciamento metagenômico completo, bem como aqueles que não disponibilizavam as sequências brutas. A busca foi realizada utilizando as palavras-chave “cervical cancer” AND “microbiota”, resultando inicialmente na identificação de 25 estudos.

Após análise dos critérios estabelecidos, foram selecionados 10 conjuntos de dados, totalizando 1.008 amostras, distribuídas em 112 casos de lesão de baixo grau (LSIL), 170 de lesão de alto grau (HSIL), 285 casos de câncer cervical (CC) e 441 controles saudáveis, provenientes de cinco países — Estados Unidos (América do Norte), Brasil (América do Sul), China (Ásia), Nigéria (África) e Espanha (Europa) — que representam cinco continentes distintos (Tabela 1).

As amostras selecionadas foram obtidas por meio do SRA Toolkit (<https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?view=software>), e cada execução de sequenciamento passou por uma filtragem individual de qualidade.

Tabela 1- Projetos selecionados para análise da microbiota cervical e vaginal com base em sequenciamento 16S rRNA.

Projeto	Origem da amostra	País	Plataforma	Região 16S	CC	HSIL	LSIL	Control	Fonte
PRJNA687644	cervical	CHINA	Illumina HiSeq 2500	V3-V4	68	0	0	4	Jiang et al. (2021)
PRJNA518153	cervical e vaginal	USA	Illumina MiSeq	V4	10	27	11	29	Laniewski et al (2018)

PRJNA687331	vaginal	CHINA	Illumina MiSeq	V3-V4	26	0	0	0	Wang et al (2021)
PRJNA431248	cervical	USA	Illumina MiSeq	V4	58	0	0	0	Lam et al (2018)
PRJEB51893	cervical	USA	Illumina MiSeq	V4	1	59	43	214	Tosado- Rodriguez et al (2023)
PRJNA933917	cervical	BRAZIL	Illumina MiSeq	V3-V4	0	22	0	21	Britto et al.(2023)
PRJNA1029035	vaginal	USA	Illumina MiSeq	V4	26	0	0	0	Tortelli et al (2025)
PRJEB83336	cervical	SPAIN	Illumina MiSeq	V3-V4	0	2	0	100	Cancio- Suárez et al. (2025)
PRJNA914231	cérvico- vaginal	NIGERIA	Illumina MiSeq	V3-V4	31	60	58	19	Musa et al (2023)
PRJNA725946	vaginal	CHINA	Illumina HiSeq 2500	V3-V4	65	0	0	54	Fan et al (2021)
TOTAL					285	170	112	441	

CC: câncer cervical; HSIL: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau ; LSIL: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau .

Fonte: Autoria própria (2025)

O processamento dos dados brutos das sequências foi realizado utilizando o pacote de software QIIME 2 (versão 2023.2)¹ (Bokulich et al., 2018). A filtragem da qualidade, replicação e remoção de quimeras foram efetuadas por meio do plugin q2-DEBLUR (Bolyen et al., 2019). Para a atribuição taxonômica, foram usados conjuntos de sequências representando cada variante gerada pelo DEBLUR. Sequências com alta qualidade foram agrupadas em ASVs (Amplicon Sequence Variants) e alinhadas ao banco de dados SILVA (16S rDNA completo) para identificação taxonômica (Quast et al., 2013). Além disso, o

QIIME 2 foi empregado para eliminar singletons, sequências provenientes de cloroplastos, mitocôndrias e arqueias, além de gerar matrizes de distância ponderadas pela métrica UniFrac (Lozupone; Hamady; Knight, 2006), bem como calcular métricas de diversidade alfa e beta, incluindo índices de riqueza e diversidade. Para as análises de diversidade e abundância relativa, utilizou-se a plataforma online MicrobiomeAnalyst 2.0 (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>). Por fim, o QIIME 2 também foi aplicado para realizar classificações utilizando machine learning (Random Forest), permitindo a predição das características das amostras e a diferenciação entre elas. Essa abordagem possibilitou identificar quais recursos — como ASVs e espécies — estavam associados a pacientes com câncer cervical em comparação a indivíduos saudáveis, bem como estimar a probabilidade de classificação das amostras em seus respectivos grupos.

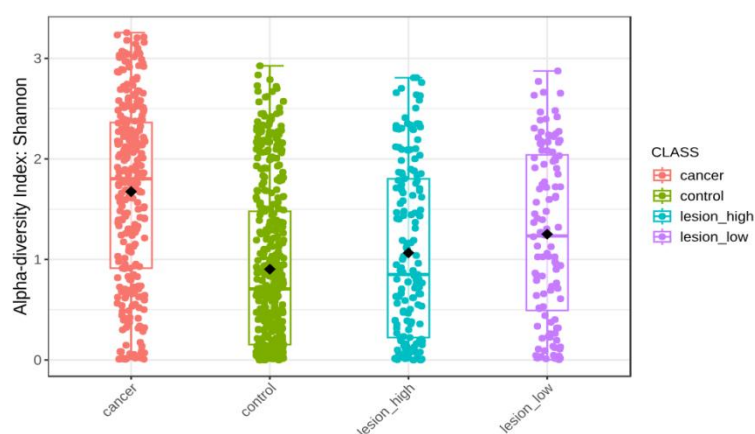
As análises estatísticas incluíram testes paramétricos e não paramétricos com o objetivo de verificar diferenças significativas entre os grupos. Dentre essas abordagens, foram utilizadas análises de variância (ANOVA) e análises de variância permutacional (PERMANOVA), permitindo uma avaliação robusta das variações na estrutura microbiana e nas métricas de diversidade observadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas ao todo 37.322.751 leituras (*Total read counts*) nas amostras analisadas. A média de contagens por amostra foi de 37.435 (*Average counts per sample*), com um valor máximo de 218.220 leituras em uma única amostra (*Maximum counts per sample*).

A diversidade alfa foi analisada por meio do índice de Shannon, com o objetivo de identificar diferenças na composição microbiana entre os grupos clínicos: controle, LSIL (*lesion_low*), HSIL (*lesion_high*) e câncer cervicovaginal. Conforme ilustrado no boxplot (Figura 5), o grupo com câncer apresentou os maiores níveis de diversidade microbiana ($p < 0,001$), seguido pelo grupo controle. Ambos os grupos com lesões cervicais (LSIL e HSIL) exibiram valores significativamente menores de diversidade em comparação ao controle ($p < 0,05$), mas sem diferença significativa entre si ($p = 0,077$). Esses achados sugerem que a presença da neoplasia está associada a uma diversidade microbiana aumentada, enquanto as lesões precursoras apresentam uma redução na diversidade quando comparadas ao grupo saudável.

Figura 5 - Alfa-diversidade dos grupos controle, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical, de acordo com o índice de Shannon.



Fonte: Autoria própria (2025)

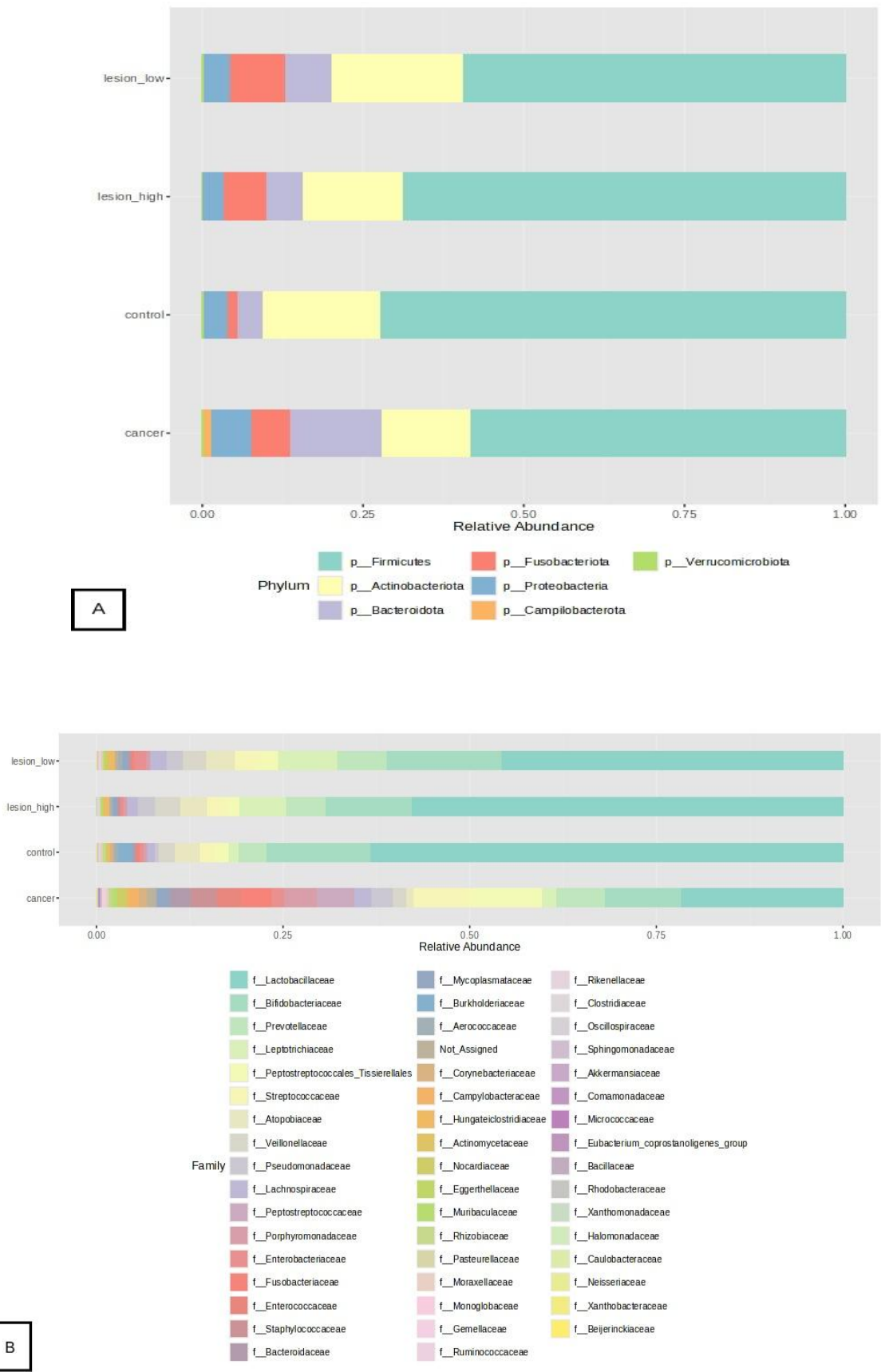
A análise da composição microbiana ao nível de filo revelou variações perceptíveis entre os grupos analisados (Figura 6A). O filo Firmicutes apresentou-se como predominante em todos os grupos, com destaque para o grupo controle. Observa-se uma tendência de redução na abundância desse filo à medida que aumenta a gravidade das lesões cervicais, sendo a menor proporção observada no grupo câncer. Por outro lado, os filos Bacteroidota, Fusobacteriota e Proteobacteria mostraram um aumento aparente nos grupos com lesões e câncer. Esses filos, compostos majoritariamente por bactérias anaeróbias estritas, têm sido associados a ambientes inflamatórios crônicos, disbiose e progressão tumoral, podendo sugerir um microbioma mais propício à persistência do HPV e ao desenvolvimento de lesões neoplásicas (Rubinstein et al., 2013; Lee et al., 2021; Fan et al., 2024; Gao et al., 2025).

A análise da abundância relativa ao nível de família (Figura 6B) confirmou esse desequilíbrio microbiano. O grupo controle apresentou predominância da família Lactobacillaceae, associada à proteção da mucosa vaginal e manutenção do pH ácido (Martin, 2016; Laniewski, 2018). À medida que as lesões evoluem, especialmente no grupo câncer, observou-se uma redução acentuada dessa família e aumento de famílias potencialmente patogênicas, como Peptostreptococcaceae, Porphyromonadaceae, Fusobacteriaceae,

Bacteroidaceae e Enterobacteriaceae, indicando um padrão de disbiose associado à progressão da doença.

De forma complementar, a composição microbiana ao nível de gênero (Figura 6C) mostrou que o grupo controle foi caracterizado principalmente pela presença de *Lactobacillus*, reconhecido como marcador de uma microbiota vaginal saudável. Com a progressão das lesões, houve diminuição expressiva desse gênero e aumento de *Prevotella* e *Bacteroides*, todos associados à disbiose e à inflamação local (Usyk et al., 2020; Wu et al., 2020; Yang et al., 2020). Nos grupos LSIL (lesion_low) e HSIL (lesion_high), observa-se uma variação no padrão de abundância do gênero *Lactobacillus*. Enquanto no LSIL há uma redução mais acentuada em comparação ao controle, no HSIL há um aumento relativo na abundância desses microrganismos. Esse comportamento sugere que a dinâmica da microbiota vaginal pode apresentar flutuações ao longo da progressão das lesões cervicais, refletindo diferentes estágios de desequilíbrio microbiano (disbiose) associados à gravidade das lesões. Os resultados deste trabalho corroboram dados de estudos anteriores que apontam para uma maior abundância do gênero *Prevotella* em casos de câncer cervical, sugerindo sua possível participação na carcinogênese associada à disbiose vaginal (Kang et al., 2020). Além disso, Li et al. (2023) destacam que o câncer do colo do útero está relacionado a uma maior diversidade microbiana, com predomínio de *Prevotella*, em contraste com a presença reduzida de *Lactobacillus*, reforçando o padrão observado neste estudo. Entre os componentes predominantes de um microbioma vaginal saudável estão espécies como *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* e *L. gasseri*, cuja presença resulta em menor diversidade da comunidade microbiana (Kovachev, 2020; Łaniewski et al., 2018). De fato, a riqueza bacteriana tende a aumentar à medida que os níveis de *Lactobacillus spp.* diminuem, sendo esse padrão frequentemente associado ao desenvolvimento de lesões precursoras do câncer cervical (Kovachev, 2020).

Figura 6 – Abundância relativa da microbiota nos grupos controle, com lesão intraepitelial de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical, classificados de acordo com o filo (A), família (B) e gênero (C).

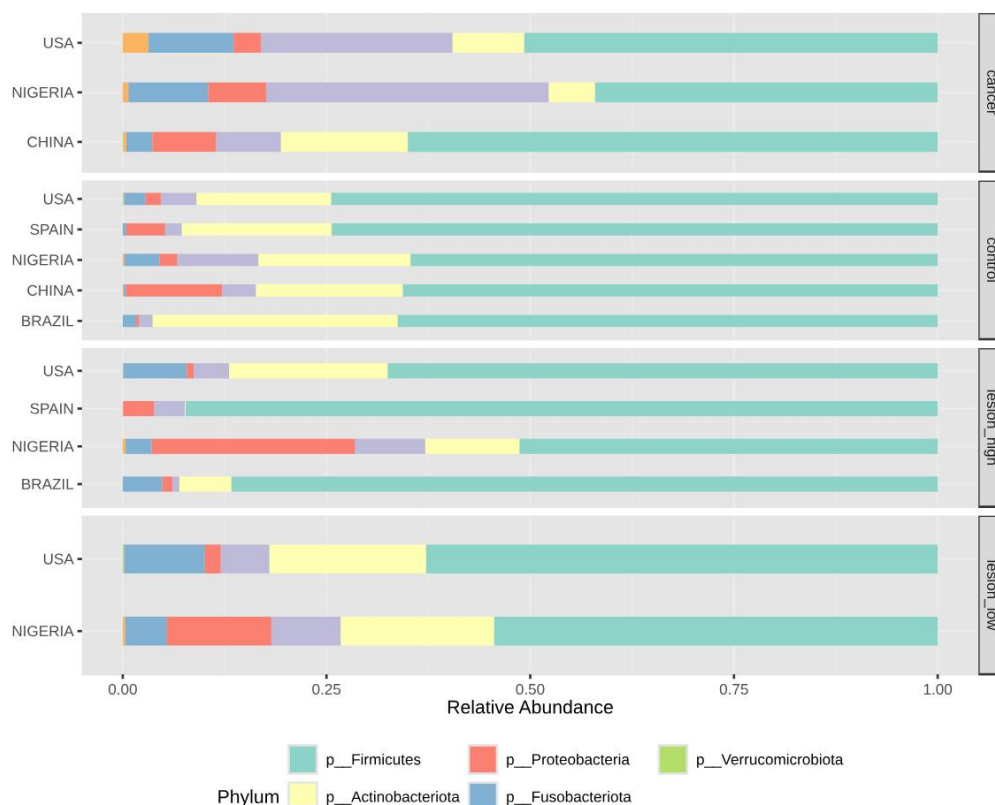




Fonte: Autoria própria (2025)

A composição da microbiota cervical variou significativamente entre os grupos clínicos e países analisados. Observou-se que o filo Firmicutes foi predominante na microbiota cervical de mulheres de todos os grupos clínicos e países, com maior proporção relativa nos grupos controle e com lesões de baixo grau, especialmente em países como EUA e Espanha, sugerindo uma possível associação com um microbioma mais estável e saudável. Em contrapartida, os grupos com lesões de alto grau e câncer apresentaram uma maior diversidade de filos bacterianos, com perfis distintos entre si. No grupo com câncer, observou-se um aumento expressivo de Fusobacteriota nas amostras da Nigéria e EUA, enquanto Proteobacteria foi mais abundante nas amostras da China e Nigéria. Já no grupo HSIL(lesion_high) destacou-se uma redução de Actinobacteriota em amostras da Espanha, além de um aumento de Proteobacteria nas amostras nigerianas. No grupo LSIL (lesion_low), Firmicutes ainda foi o filo predominante, mas já se observa um discreto aumento de Fusobacteriota nos países como Nigéria e EUA, indicando uma possível transição na composição microbiana associada à progressão das lesões (Figura 7).

Figura 7- Distribuição dos principais filos bacterianos na microbiota cervicovaginal em diferentes países de origem



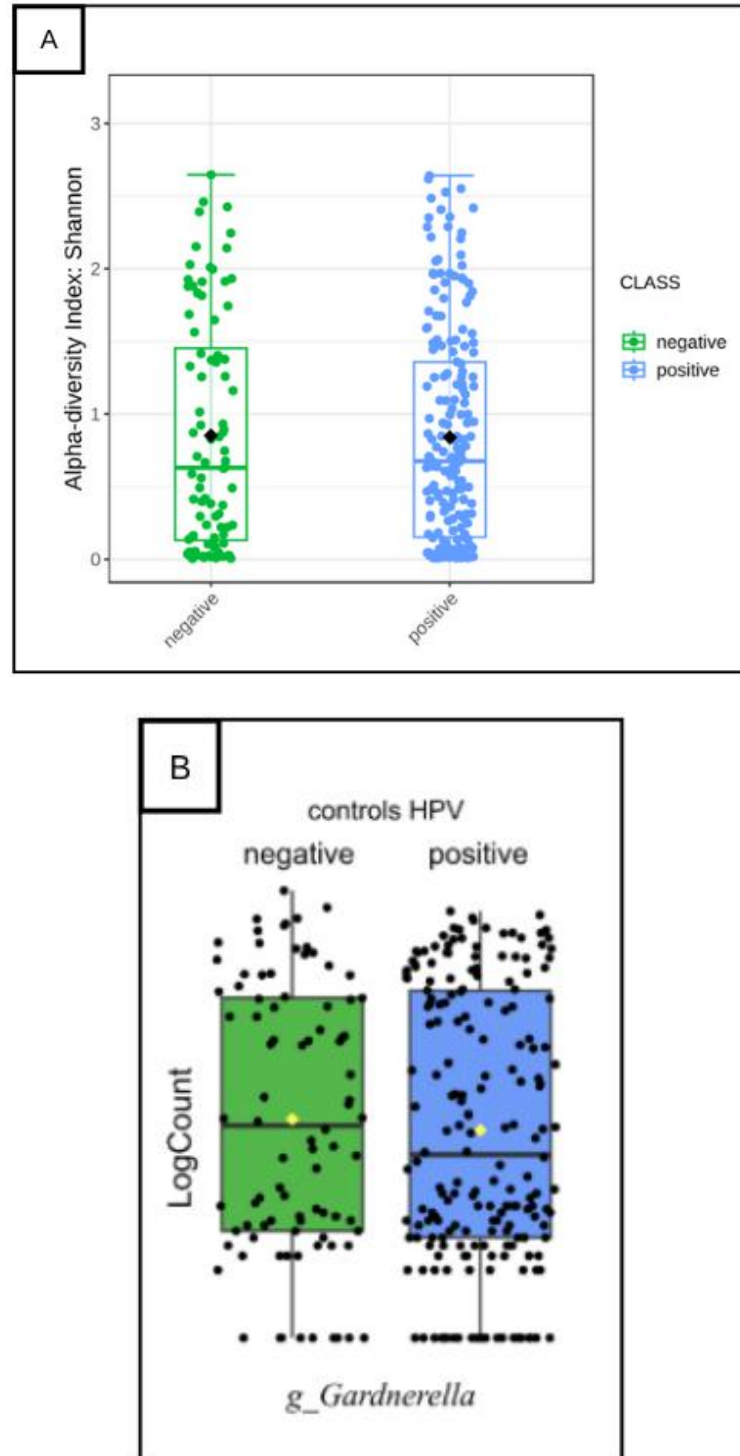
Fonte: Autoria própria (2025)

Quanto ao HPV, buscou-se avaliar, por meio da alfa-diversidade, se existia diferença de riqueza entre os grupos HPV-negativo e HPV-positivo. No entanto, neste estudo, não foi observada diferença significativa na riqueza microbiana ($p = 0,897$) (Figura 8A). Esse resultado corrobora com estudos anteriores, como o de Chao et al. (2020), que relatou que não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao índice de Shannon, o mesmo estudo relatou que os gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Enterococcus* foram significativamente mais abundantes no grupo com HPV persistente, com destaque para as espécies *Prevotella bivia*, *Enterococcus durans* e *Porphyromonas uenonis*. Por outro lado, *Lactobacillus iners* e *Prevotella disiens* foram mais prevalentes em mulheres HPV-negativas.

No que diz respeito a biomarcadores específicos, a análise da abundância do gênero *Gardnerella* entre os grupos HPV-positivo e negativo também não revelou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,385$) (Figura 8B), o que impossibilita sua associação direta com o status de infecção por HPV nesta população. Esse resultado diverge de estudos como o de Li et al. (2023), conduzido em mulheres chinesas, que encontraram *Gardnerella* mais abundante em casos de NIC HPV-positivo. Diante disso, foram explorados novos potenciais biomarcadores (Tabela 2). Observou-se que o gênero *Faecalibacterium* foi significativamente mais abundante em mulheres HPV-negativas, achado também relatado por Ritu (2019). Esse gênero possui propriedades anti-inflamatórias, como o bloqueio da via NF- κ B, o que pode indicar um papel protetor frente à infecção viral. Em contrapartida, os gêneros *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* e *Enterococcus* foram mais abundantes em mulheres HPV-positivas, o que está alinhado com os achados de Camargo (2022), que

observou correlação entre maior abundância desses microrganismos e maiores cargas virais de HPV.

Figura 8- Alfa-diversidade entre grupos HPV-negativo e positivo (A) Boxplot da abundância logarítmica de *Gardnerella* entre grupos HPV-negativo e HPV-positivo (B).



Fonte: Autoria própria (2025)

Tabela 2 - Diferença de abundância entre os controles com HPV negativo e positivo de acordo com os valores de EdgeR, sendo os valores positivos mais abundantes em HPV negativo e os negativos em HPV positivo.

Gênero	log2FC	logCPM	Pvalues	FDR
<i>Faecalibacterium</i>	33.894	89.646	4,14E-29	2,40E-27
<i>Burkholderia_Caballeronia_Paraburkholderia</i>	-77.452	13.248	3,04E-26	8,82E-25
<i>Enterococcus</i>	-63.445	14.359	1,58E-16	3,05E-15
<i>Corynebacterium</i>	2.786	12.764	1,39E-10	2.02e-13
<i>Haemophilus</i>	-33.907	11.086	4,83E-08	5,61E-07
<i>Neisseria</i>	-20.119	80.689	1,16E-07	1,12E-06
<i>Peptostreptococcus</i>	-34.699	14.045	8,85E-07	7,34E-06
<i>Finegoldia</i>	21.553	12.61	1,36E-05	8,80E-05
<i>Acinetobacter</i>	-22.603	10.558	1,36E-05	8,80E-05
<i>Escherichia_Shigella</i>	22.638	13.764	1,09E-03	6,34E-03
<i>Blautia</i>	12.654	83.859	3,59E-03	1,83E-02
<i>Fenollaria</i>	20.196	12.674	3,78E-04	1,83E-02
<i>Clostridium</i>	-21.571	10.706	1,48E-02	6,59E-02
<i>Mobiluncus</i>	-20.398	11.434	5,74E-02	2,38E-01
<i>Bifidobacterium</i>	-22.573	13.138	2,37E-01	9,15E-01
<i>Muribaculaceae</i>	-16.884	11.574	8,15E-01	0.00029553
<i>Ureaplasma</i>	13.626	12.404	0.00048084	0.0016405
<i>Parvimonas</i>	-16.273	12.779	0.00057159	0.0018418
<i>Campylobacter</i>	12.561	12.617	0.0015856	0.0048402
<i>Peptoniphilus</i>	11.627	14.15	0.0022871	0.0066325
<i>Staphylococcus</i>	11.747	13.829	0.0029308	0.0080946
<i>Veillonella</i>	0.93389	12.234	0.016703	0.044036
<i>Aerococcus</i>	0.9493	12.929	0.020503	0.051702

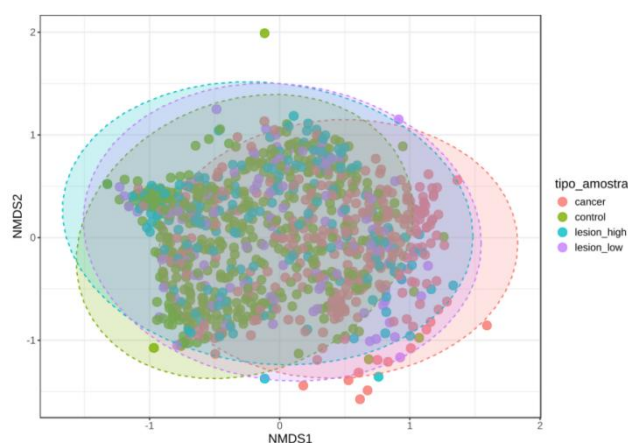
Fonte: Autoria própria (2025)

A ordenação por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) foi utilizada para avaliar a composição das comunidades microbianas entre os diferentes grupos de amostras: controle, LSIL (lesion_low), HSIL (lesion_high) e câncer. O gráfico resultante (Figura 9) mostrou que, apesar de haver sobreposição entre os grupos, as amostras pertencentes ao grupo câncer tendem a se posicionar de forma mais afastada das demais, sugerindo diferenças composicionais. As elipses representando intervalos de confiança de 95% indicam maior dispersão no grupo *câncer*, enquanto os grupos LSIL (lesion_low), HSIL(lesion_high) e controle apresentaram maior proximidade entre si.

Os testes estatísticos por PERMANOVA revelaram diferenças estatisticamente significativas em quase todas as comparações. A comparação entre o grupo controle e o grupo câncer apresentou o maior valor de F ($F = 28,718$; $p = 0,001$; $FDR = 0,0012$), indicando uma distinção marcante na composição da microbiota entre indivíduos saudáveis e pacientes com câncer cervical. Comparações envolvendo os grupos de lesão também demonstraram significância estatística, como HSIL(lesion_high) vs câncer ($F = 13,134$; $p = 0,001$) e LSIL (lesion_low) vs câncer ($F = 6,4701$; $p = 0,001$), sugerindo uma transição microbiana associada à progressão tumoral. A comparação entre os grupos controle vs HSIL(lesion_high) ($F = 5,7607$) e controle vs LSIL (lesion_low) ($F = 4,2854$) também revelou diferenças significativas ($p = 0,001$), apontando que mesmo lesões precoces estão associadas a mudanças perceptíveis no ecossistema microbiano vaginal.

Por fim, a diferença entre HSIL (lesion_high) e LSIL (lesion_low) apresentou valor de p de 0,046, indicando uma distinção estatisticamente significativa, embora mais sutil, entre os dois tipos de lesão intraepitelial. Esses dados reforçam a hipótese de que a composição da microbiota cervicovaginal se altera progressivamente desde o estado saudável até o câncer, passando por perfis distintos nas lesões de baixo e alto grau.

Figura 9 - Análise de beta diversidade por NMDS dos grupos controle, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical



Fonte: Autoria própria (2025)

A figura 10 apresenta a comparação da abundância relativa das principais famílias e gêneros bacterianos identificados nos diferentes grupos clínicos: controle, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical. Cada família e gênero foi analisado em relação à sua distribuição nos quatro grupos, permitindo a observação de padrões específicos de alteração da microbiota ao longo da progressão da doença.

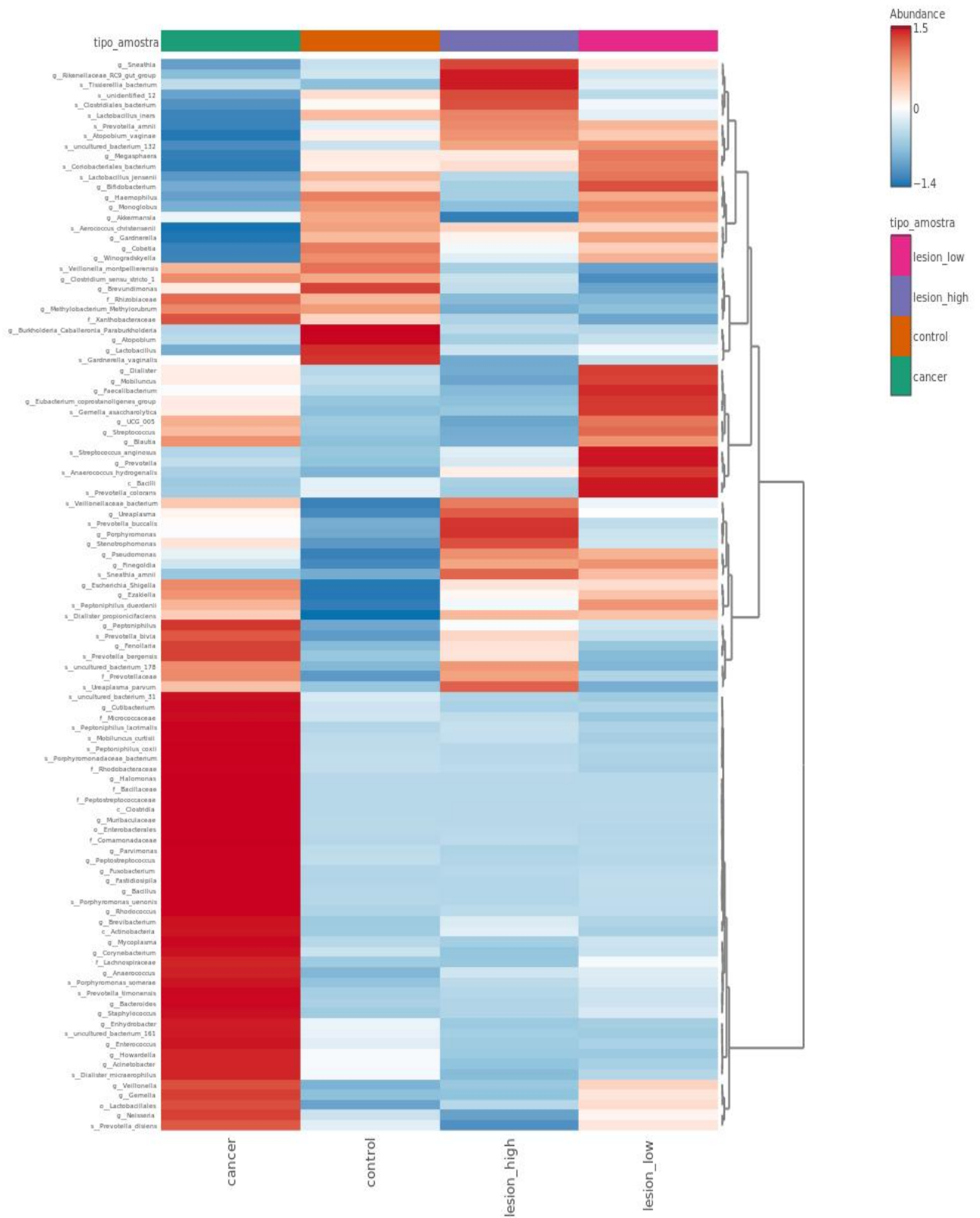
O gênero *Lactobacillus* mostrou-se marcadamente mais abundante no grupo controle, evidenciando seu papel protetor na microbiota vaginal saudável. Esse gênero é amplamente reconhecido por manter o pH vaginal ácido e inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (Martin, 2016; Laniewski, 2018). A diminuição de sua abundância nos grupos de lesão e, principalmente, no grupo câncer, reflete um quadro de disbiose, com perda da dominância de *Lactobacillus*.

A espécie *Prevotella buccalis* foi mais abundante no grupo HSIL. Esse achado é consistente com estudos anteriores, que demonstram uma relação inversa entre a abundância de *Prevotella* e a de *Lactobacillus*, sugerindo que o aumento de *Prevotella* pode refletir um estado de disbiose (So et al., 2020). Além disso, *Prevotella buccalis* já foi significativamente associada ao risco de neoplasia intraepitelial escamosa de alto grau e câncer cervical, reforçando sua possível participação na progressão da doença (Si et al., 2017). O gênero *Sneathia* demonstrou baixa abundância no grupo controle, mas houve um aumento perceptível no grupo LSIL, sendo ainda mais predominante no grupo HSIL. Esse padrão de distribuição acompanha a progressão das lesões cervicais e está em concordância com Wen et al. (2025), que relataram um aumento significativo de bactérias potencialmente patogênicas, incluindo *Sneathia*, em estágios mais avançados das lesões. O *Lactobacillus iners* foi identificado com maior abundância nos grupos controle e HSIL.

No que se refere à espécie *Prevotella amnii*, observou-se baixa abundância nos grupos controle e câncer, com um aumento significativo no grupo LSIL e um pico ainda mais elevado no grupo HSIL. De forma semelhante, outro estudo identificou *P. amnii* prevalente em mulheres com lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL), reforçando seu possível papel no início da disbiose microbiana (Chen et al., 2020). Além disso, o gênero *Prevotella* esteve presente de forma marcante no grupo LSIL, incluindo espécies como *Prevotella colorans*. Espécies como *Prevotella bivia* e *Prevotella bergensis* apresentaram maior abundância no grupo câncer e também foram detectadas no grupo HSIL.

No grupo câncer, observou-se uma elevada abundância de diversos gêneros bacterianos, destacando-se *Cutibacterium*, *Halomonas*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Rantidispila*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Brevibacterium*, *Mycoplasma*, *Corynebacterium*, *Anaerococcus*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Enhydrobacter*, *Howeella*, *Acinetobacter*, *Veillonella*, *Gemella* e *Neisseria*. As famílias bacterianas mais predominantes incluíram Micrococcaceae, Rhodobacteraceae, Bacillaceae, Peptostreptococcaceae e Comamonadaceae. No nível de espécie, as mais abundantes foram *Peptoniphilus lacrimalis*, *Mobiluncus curtisii*, *Peptoniphilus coxii*, *Porphyromonas uenonis*, *Porphyromonas somerae*, *Prevotella timonensis*, *Dialister micrococcus* e *Prevotella disiens*. Corroborando com esses resultados, estudos anteriores também identificaram *Mobiluncus curtisii* e *Porphyromonas somerae* com maior prevalência em pacientes com câncer ginecológico (Barczyński et al., 2023; Walsh et al., 2019).

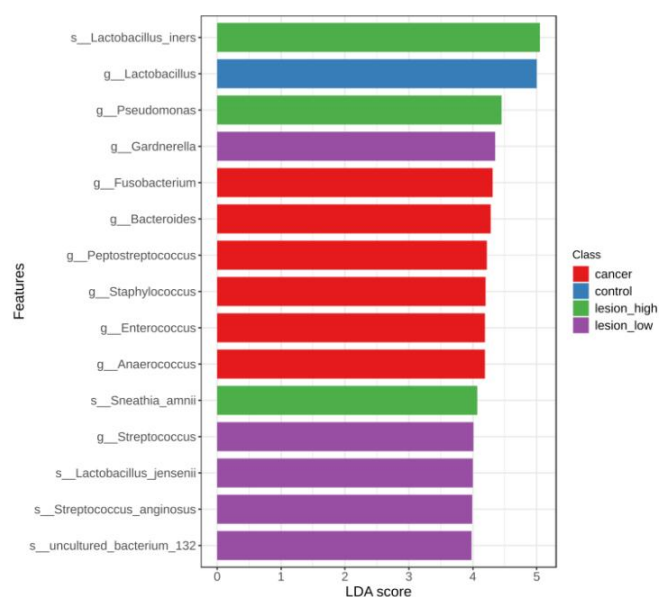
Figura 10- Heatmap mostrando as principais diferenças de abundância entre os grupos controle, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical.



Fonte: Autoria própria (2025)

A análise discriminante linear (LDA) permitiu identificar os principais grupos bacterianos associados às diferentes classes clínicas avaliadas: câncer, controle, lesão de alto grau e lesão de baixo grau. Observou-se que a microbiota associada ao câncer apresentou uma maior diversidade de microrganismos potencialmente patogênicos, destacando-se os gêneros *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Anaerococcus*, que apresentaram os maiores escores de discriminação para esta classe. Por outro lado, o grupo controle foi caracterizado principalmente pela presença do gênero *Lactobacillus*, reconhecido como um marcador de microbiota vaginal saudável e protetora, o que corrobora com evidências anteriores que também identificaram a dominância de *Lactobacillus* em mulheres HPV-negativas (Li et al., 2023). Na classe de lesão de alto grau, destacaram-se *Lactobacillus iners*, *Pseudomonas* e *Sneathia amnii*, microrganismos frequentemente associados a estados de transição e disbiose. De forma consistente, Mitra (2015) relatou que amostras de lesão de alto grau (HSIL) apresentaram uma super-representação significativa do gênero *Sneathia*, principalmente *Sneathia sanguinegens*. Apesar de *Lactobacillus* estarem associados à microbiota saudável, diferente de outras espécies do gênero, *L. iners* possui um genoma reduzido e não consegue produzir ácido D-lático nem H₂O₂ (Petrova, 2017). Em vez disso, gera ácido L-lático, associado a maior susceptibilidade a infecções virais, e secreta inerolisina, uma toxina que compromete a integridade do epitélio vaginal, semelhante à vaginolisina produzida por *Gardnerella* (Rampersaud, 2011; Macklaim, 2011; Petrova, 2017). Já as lesões de baixo grau apresentaram associações com os gêneros *Gardnerella*, *Streptococcus* e as espécies *Lactobacillus jensenii* e *Streptococcus anginosus*. Esses achados reforçam a hipótese de que a composição da microbiota vaginal se altera progressivamente desde o estado saudável até o câncer, passando por diferentes perfis associados às lesões cervicais de baixo e alto grau (Figura 11).

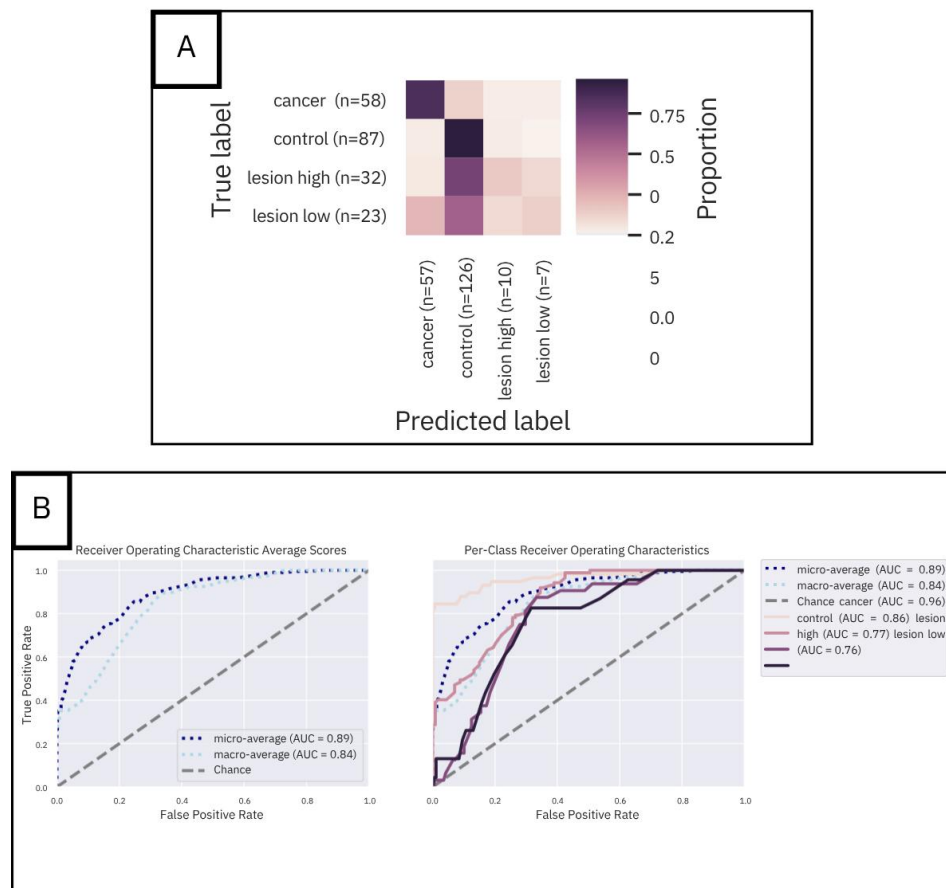
Figura 11- LDA score mostrando os organismos mais significativos nos grupos controle, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e câncer cervical, classificados de acordo com o nível taxonômico de gênero ou espécie ao qual pertencem.



Fonte: Autoria própria (2025)

A avaliação do desempenho do modelo de classificação de machine learning (Random Forest) demonstrou resultados satisfatórios, especialmente na detecção de casos de câncer. A matriz de confusão evidenciou uma alta proporção de classificações corretas para as classes câncer e controle, indicando que o modelo foi eficiente em identificar essas condições. Por outro lado, observou-se uma maior taxa de erros na diferenciação entre as classes de HSIL (*lesion_high*) e LSIL (*lesion_low*), com confusões frequentes principalmente em relação à classe controle. Essa dificuldade é esperada, considerando a sobreposição de características clínicas e biológicas entre as lesões. As curvas ROC demonstraram AUC de 0,96 para a classe câncer e 0,86 para a classe controle. Já para as classes HSIL e LSIL, os valores de AUC foram menores (0,77 e 0,74, respectivamente), indicando uma performance moderada. A macro AUC geral foi de 0,84 e a micro AUC atingiu 0,89, evidenciando uma boa capacidade discriminativa do modelo de forma geral. Assim, conclui-se que o modelo é robusto para distinguir casos de câncer e indivíduos controles, mas apresenta limitações na diferenciação entre os diferentes graus de lesão. Esses resultados sugerem a necessidade de aperfeiçoamentos, como o aumento do número de amostras das classes menos representadas e a incorporação de novas variáveis ou biomarcadores que potencialmente melhorem a acurácia na identificação das lesões cervicais (Figura 12).

Figura 12- Desempenho na Classificação de Amostras de Câncer, Controle e Lesões Cervicais: Matriz de Confusão (A) e Curvas ROC (B).



Fonte: Autoria própria (2025)

6 CONCLUSÃO

Este estudo reforça a importância da microbiota cervicovaginal como um componente-chave no processo de carcinogênese cervical. A análise de 1.008 amostras de diferentes populações revelou que a progressão das lesões cervicais está associada a alterações significativas na composição e diversidade microbiana local. Observou-se uma redução progressiva na diversidade alfa e uma maior dissimilaridade beta nos estágios avançados da doença, com perda de dominância de *Lactobacillus* e aumento de microrganismos associados à disbiose, como *Gardnerella*, *Bacteroides*, *Prevotella* e *Fusobacterium*. Além disso, os resultados sugerem que a presença ou ausência de determinados gêneros bacterianos, como *Faecalibacterium* (associado ao grupo HPV-negativo) e *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* e *Enterococcus* (mais abundante em HPV-positivas), pode estar relacionada ao status de infecção pelo HPV, ainda que mais estudos sejam necessários para validar esses achados como biomarcadores. A aplicação de algoritmos de machine learning demonstrou alto desempenho na distinção entre casos de câncer e indivíduos controles, mas menor acurácia na classificação de lesões intermediárias, evidenciando a necessidade de modelos mais refinados e bancos de dados mais equilibrados. Portanto, este trabalho contribui significativamente para a compreensão da relação entre microbiota e câncer cervical, apontando caminhos promissores para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas não invasivas baseadas em assinaturas microbianas. Futuras pesquisas, com integração de dados multiômicos e validação clínica, poderão ampliar o potencial da microbiota como ferramenta complementar na prevenção, diagnóstico e prognóstico do câncer do colo do útero.

REFERÊNCIAS

- ALDUNATE, M.; TYSSEN, D.; JOHNSON, A.; ZAKIR, T.; SONZA, S.; MOENCH, T.; CONE, R.; TACHEDJIAN, G. Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 68, p. 2015–2025, 2013. doi: 10.1093/jac/dkt156.
- ALVES, J. A. B.; NUNES, M. S.; FAKHOURI, R.; MARTINS-FILHO, P. R. S.; RIBEIRO, C. O. M.; VALENÇA, T. S.; et al. Pap smears: frequency of *Gardnerella vaginalis*, *Candida* spp., *Trichomonas vaginalis* and pill use or copper intrauterine device use. **International Archives of Medicine**, v. 9, dec. 2024. Disponível em: <http://imed.pub/ojs/index.php/iam/article/view/1830>.
- AMABEBE, E.; ANUMBA, D. O. C. The vaginal microenvironment: the physiologic role of *Lactobacilli*. **Front. Med.**, v. 5, p. 181, 2018. doi: 10.3389/fmed.2018.00181.
- ANTONIO, M. A.; HAWES, S. E.; HILLIER, S. L. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 1950–1956, 1999.
- BARCZYŃSKI, B.; FRĄSZCZAK, K.; GRYWALSKA, E.; KOTARSKI, J.; KORONA-GŁOWNIAK, I. Vaginal and cervical microbiota composition in patients with endometrial cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 24, n. 9, p. 8266, 2023. doi: 10.3390/ijms24098266.
- BHATT, A. P.; REDINBO, M. R.; BULTMAN, S. J. The role of the microbiome in cancer development and therapy. **CA Cancer J. Clin.**, v. 67, p. 326–344, 2017. doi: 10.3322/caac.21398.
- BI, Y.; HU, J.; ZENG, L.; CHEN, G.; CAI, H.; CAO, H.; et al. Characteristics of HPV integration in cervical adenocarcinoma and squamous carcinoma. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 149, n. 20, p. 17973–17986, 2023.
- BOKULICH, N. A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90, 2018.
- BORCARD, D.; GILLET, F.; LEGENDRE, P. Community diversity. In: **Numerical Ecology with R**. Switzerland: Springer International Publishing, 2018. p. 369–412.
- BOLYEN, E.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8; p. 852–857, 2019. 10.1038/s41587-019-0209-9
- BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. **Ecol. Monogr.**, v. 27, p. 326–349, 1957. doi: 10.2307/1942268.
- BRITTO, A. M. A.; SIQUEIRA, J. D.; CURTY, G.; GOES, L. R.; POLICARPO, C.; MEYRELLES, A. R.; FURTADO, Y.; et al. Microbiome analysis of Brazilian women cervix reveals specific bacterial abundance correlation to RIG-like receptor gene expression. **Front. Immunol.**, v. 14, art. 1147950, abr. 2023. doi: 10.3389/fimmu.2023.1147950.

- CANCIO-SUÁREZ, M. R.; MORENO, E.; RUBIDO, C. V.; SALVADOR, M.; MORENO, A.; LUNA, L.; DÍAZ-GARCÍA, C. et al. Cervical Microbiota Diversity and Functional Shifts in the Development of Cervical High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions. **MedRxiv**, 2025. <https://doi.org/10.1101/2025.03.27.25324816>.
- CAMARGO, M.; VEGA, L.; MUÑOZ, M.; SÁNCHEZ, R.; PATARROYO, M. E.; RAMÍREZ, R. D.; PATARROYO, M. A. Changes in the Cervical Microbiota of Women with Different High-Risk Human Papillomavirus Loads. **Viruses**, 14 (12): 2674, 2022. <https://doi.org/10.3390/v14122674>.
- CHAO X, SUN T, WANG S, TAN X, FAN Q, SHI H, ZHU L, LANG J. Research of the potential biomarkers in vaginal microbiome for persistent high-risk human papillomavirus infection. **Ann Transl Med**. 2020 Feb;8(4):100. doi: 10.21037/atm.2019.12.115.
- CHEN, J.; BITTINGER, K.; CHARLSON, E. S.; HOFFMANN, C.; LEWIS, J.; WU, G. D.; et al. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2106–2113, 2012. doi: 10.1093/bioinformatics/bts342.
- CHEN, Y.; QIU, X.; WANG, W.; LI, D.; WU, A.; HONG, Z.; et al. Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia progression are associated with increased vaginal microbiome diversity in a Chinese cohort. **BMC Infect. Dis.**, v. 20, p. 1–12, 2020. doi: 10.1186/s12879-020-05103-1.
- CONTI, C.; MALACRINO, C.; MASTROMARINO, P. Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal lactobacilli. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60, p. 19–26, 2009.
- FAN, J.; FU, Y.; PENG, W.; LI, X.; SHEN, Y.; GUO, E.; et al. Multi-omics characterization of silent and productive HPV integration in cervical cancer. **Cell Genom.**, v. 3, n. 1, art. 100211, 2023.
- FAN, Q.; WU, Y.; LI, M.; AN, F.; YAO, L.; WANG, M.; WANG, X.; et al. Lactobacillus spp. create a protective micro-ecological environment through regulating the core fucosylation of vaginal epithelial cells against cervical cancer. **Cell Death & Dis.**, v. 12, n. 12, art. 1094, 2021. doi: 10.1038/s41419-021-04388-y.
- FAN, Z.; HAN, D.; FAN, X.; ZENG, Y.; ZHAO, L. Analysis of the correlation between cervical HPV infection, cervical lesions and vaginal microecology. **Front Cell Infect Microbiol**, v.14, p,1405789, 2024. doi: 10.3389/fcimb.2024.1405789.
- FERLAY, J.; ERVIK, M.; LAM, F.; et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today (Versão 1.0). *International Agency for Research on Cancer*, 2024. Acesso em: 10 mar. 2025. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today>.
- FETTWEIS, J. M.; BROOKS, J. P.; SERRANO, M. G.; SHETH, N. U.; GIRERD, P. H.; EDWARDS, D. J.; STRAUSS, J. F.; JEFFERSON, K. K.; BUCK, G. A. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. **Microbiology**, v. 160, p. 2272, 2014. doi: 10.1099/mic.0.081034-0.

- GAJER, P.; et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. **Sci. Transl. Med.**, v. 4, art. 132ra152, 2012.
- GAO, Y. Y.; LI, X. X.; ZUO, H.; ZHANG, P. Analysis of the Relationship Between Cervical Cancer Progression and the Microbiome. **Int J Gen Med.**, v.18, p.2449-2460, 2025. doi: 10.2147/IJGM.S520936.
- GILBERT, J. A.; et al. Current understanding of the human microbiome. **Nat. Med.**, v. 24, p. 392–400, 2018.
- GILBERT, J. A.; LYNCH, S. V. Community ecology as a framework for human microbiome research. **Nat. Med.**, v. 25, p. 884–889, 2019. doi: 10.1038/s41591-019-0464-9.
- GONG, Z.; LUNA, Y.; YU, P.; FAN, H. Lactobacilli inactivate *Chlamydia trachomatis* through lactic acid but not H₂O₂. **PLoS One**, v. 9, art. e107758, 2014.
- GRAVER, M. A.; WADE, J. J. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 10, art. 8, 2011.
- HICKEY, R. J.; ZHOU, X.; PIERSON, J. D.; RAVEL, J.; FORNEY, L. J. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. **Transl. Res.**, v. 22, p. 267–282, 2012.
- HU, Z.; ZHU, D.; WANG, W.; LI, W.; JIA, W.; ZENG, X.; et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. **Nat. Genet.**, v. 47, n. 2, p. 158–163, 2015.
- HUANG, J.; QIAN, Z.; GONG, Y.; WANG, Y.; GUAN, Y.; HAN, Y.; et al. Comprehensive genomic variation profiling of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer identifies potential targets for cervical cancer early warning. **J. Med. Genet.**, v. 56, n. 3, p. 186–194, 2019.
- IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. *Human papillomaviruses*. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.**, v. 90, p. 1–636, 2007.
- INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Nomenclatura Brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas. [Internet]. Brasil; [Acesso em: 26 out. 2024]. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Nomenclaturas_2_1705.pdf.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 12 jan. 2025.
- ISMAEL, J. *Instituto Nacional del Cáncer* [Internet]. Argentina: gob.ar, 2019. Disponível em: <https://www.argentina.gob.ar/salud/inc>.

JIANG, L.; LI, B.; ZHANG, Y.; MA, S.; LIU, C.; LIANG, F.; WEI, Z.; HUANG, T.; WANG, R. Influence of pelvic intensity-modulated radiation therapy with concurrent cisplatin-based chemotherapy of cervical cancer on the vaginal microbiome. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 615439, fev. 2021. DOI: [10.3389/fonc.2021.615439](https://doi.org/10.3389/fonc.2021.615439).

KANG, G.-U. et al. Dynamics of fecal microbiota with and without invasive cervical cancer and its application in early diagnosis. **Cancers**, v. 12, p. 3800, 2020. DOI: [10.3390/cancers12123800](https://doi.org/10.3390/cancers12123800).

KATKI, H. A. et al. Five-year risks of CIN 2+ and CIN 3+ among women with HPV-positive and HPV-negative LSIL Pap results. **J. Low. Genit. Tract Dis.**, v. 17, supl. 1, p. S43–S49, abr. 2013. DOI: [10.1097/LGT.0b013e3182854269](https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e3182854269).

KOVACHEV, S. M. Cervical cancer and vaginal microbiota changes. **Arch. Microbiol.**, v. 202, p. 323–327, 2020. DOI: [10.1007/s00203-019-01747-4](https://doi.org/10.1007/s00203-019-01747-4).

KYRGIU, M.; MITRA, A.; MOSCICKI, A. B. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? **Transl. Res.**, v. 179, p. 168–182, 2017. DOI: [10.1016/j.trsl.2016.07.004](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.07.004).

LAM, K. C. et al. *Transkingdom network reveals bacterial players associated with cervical cancer gene expression program*. **PeerJ**, v. 6, e5590, set. 2018. DOI: [10.7717/peerj.5590](https://doi.org/10.7717/peerj.5590).

ŁANIEWSKI, P.; HERBST-KRALOVETZ, M. In: SKINNER, M. K. (ed.). Encyclopedia of Reproduction. **Academic Press: Elsevier**, v. 2, p. 353–359, 2018.

ŁANIEWSKI, P. et al. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women. **Sci. Rep.**, v. 8, p. 7593, 2018. DOI: [10.1038/s41598-018-25879-7](https://doi.org/10.1038/s41598-018-25879-7).

ŁANIEWSKI, P.; ILHAN, Z. E.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy. **Nat. Rev. Urol.**, v. 17, n. 4, p. 232–250, abr. 2020. DOI: [10.1038/s41585-020-0286-z](https://doi.org/10.1038/s41585-020-0286-z).

LEE Y. H.; KANG G. U.; JEON S. Y.; TAGELE S. B.; PHAM H. Q.; KIM M. S.; et al. Vaginal microbiome-based bacterial signatures for predicting the severity of cervical intraepithelial neoplasia. **Diagnostics (Basel)**, v. 10, p. 1013, 2020. doi: [10.3390/diagnostics10121013](https://doi.org/10.3390/diagnostics10121013)

LETO, M.; PORRO, A.; JÚNIOR, G.; TOMIMORI, J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **An Bras Dermatol.**, v.86, p.307-317, 2011. doi: [10.1590/s0365-05962011000200014](https://doi.org/10.1590/s0365-05962011000200014).

LEWIS, F. M.; BERNSTEIN, K. T.; ARAL, S. O. Vaginal microbiome and its relationship to behavior, sexual health, and sexually transmitted diseases. **Obstet. Gynecol.**, v.129, p. 643–654, 2017.

LI, X.; WU, J.; WU, Y.; DUAN, Z.; LUO, M.; LI, L.; LI, S.; JIA, Y. Imbalance of Vaginal Microbiota and Immunity: Two Main Accomplices of Cervical Cancer in Chinese Women. **Int J Womens Health**. 2023

LI, C.; ZHANG, Z.; YANG, Y.; LIAO, H. Changes in the cervicovaginal microbiota composition of HPV16-infected patients after clinical treatment. **Cancer Med.**, v. 11, n. 24, p. 5037–5049, 2022. doi: 10.1002/cam4.4801.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol**, v.71, p.8228–8235, 2005. doi: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.

LOZUPONE, C. A.; HAMADY, M.; KELLEY, S. T.; KNIGHT, R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 1576–1585, 2007. DOI: 10.1128/AEM.01996-06.

LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R. UniFrac--an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. **BMC bioinformatics**, v. 7, p. 371, 7 ago. 2006.

MA, B.; FORNEY, L. J.; RAVEL, J. Vaginal microbiome: Rethinking health and disease. **Annu. Rev. Microbiol.**, [S.l.], v. 66, p. 371–389, 2012. DOI: 10.1146/annurev-micro-092611-150157.

MACKLAIM, J. M. et al. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, p. 4688–4695, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1000086107.

MALDONADO-BARRAGAN, A. et al. Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman. **BMC Microbiol.**, v. 16, p. 37, 2016. DOI: 10.1186/s12866-016-0657-6.

MARTIN, D. H. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. **Am. J. Med. Sci.**, v. 343, p. 2–9, 2012. DOI: 10.1097/MAJ.0b013e31823ea228.

MASSAD, L. S. et al. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. **Obstet. Gynecol.**, v. 121, n. 4, p. 829–846, abr. 2013. DOI: 10.1097/AOG.0b013e3182883a34.

MCBRIDE, A. A.; WARBURTON, A. O papel da integração na progressão oncogênica de cânceres associados ao HPV. **PLoS Pathog.**, v. 13, n. 4, e1006211, 2017.

MIRMONSEF, P. et al. Glycogen levels in undiluted genital fluid and their relationship to vaginal pH, estrogen, and progesterone. **PLoS One**, v. 11, e0153553, 2016.

MITRA, A. et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 16865, 2015. DOI: 10.1038/srep16865.

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**, v. 4, p. 58, 2016. DOI: 10.1186/s40168-016-0203-0.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat. Rev. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.

MUSA, J. et al. Vaginal microbiome community state types and high-risk human papillomaviruses in cervical precancer and cancer in North-Central Nigeria. **BMC Cancer**, v. 23, n. 1, p. 683, 2023. DOI: 10.1186/s12885-023-11187-5.

NAKAGAWAI, J.; SCHIRME, J.; BARBIER, M. Human Papillomavirus (HPV) and uterine cervical cancer. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 63, n. 2, p. 307–311, mar./abr. 2010. DOI: 10.1590/s0034-71672010000200021.

NJOKU, K.; CROSBIE, E. J. Does the vaginal microbiome drive cervical carcinogenesis? **BJOG**, v. 127, n. 2, p. 181, 2020.

PARTRIDGE, E. E. et al. Rastreamento do câncer do colo do útero. **J. Natl. Compr. Canc. Netw.**, v. 12, p. 333–341, 2014. DOI: 10.6004/jnccn.2014.0035.

PETROVA, M. I. et al. Lactobacillus iners: Friend or foe? **Trends Microbiol.**, v. 25, p. 182–191, 2017. DOI: 10.1016/j.tim.2016.11.007.

PETT, M.; COLEMAN, N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? **J. Pathol.**, v. 212, n. 4, p. 356–367, 2007.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, p. D590–596, jan. 2013.

RAMPERSAUD, R. et al. Inerolysin, a cholesterol-dependent cytolysin produced by Lactobacillus iners. **J. Bacteriol.**, v. 193, p. 1034–1041, 2011. DOI: 10.1128/JB.00694-10.

RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, p. 4680–4687, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1002611107.

RITU, W.; ENQI, W.; ZHENG, S.; WANG, J.; LING, Y.; WANG, Y. Evaluation of the Associations Between Cervical Microbiota and HPV Infection, Clearance, and Persistence in Cytologically Normal Women. **Cancer Prevention Research**, v.12, n.1, p. 43–56, 2019. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-18-0233>.

RUBINSTEIN, M.R.; WANG, X.; LIU, W.; HAO, Y.; CAI, G.; HAN, Y. W. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling

via its FadA adhesin. **Cell Host Microbe**, v.14, p.195–206, 2013. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012.

SI, J.; YOU, H. J.; YU, J.; SUNG, J.; KO, G. *Prevotella* as a hub for vaginal microbiota under the influence of host genetics and their association with obesity. **Cell Host Microbe**, v. 21, n. 1, p. 97–105, 2017. doi: 10.1016/j.chom.2016.11.010.

SO, K. A.; YANG, E. J.; KIM, N. R.; HONG, S. R.; LEE, J. H.; HWANG, C. S.; SHIM, S. H.; LEE, S. J.; KIM, T. J. Changes of vaginal microbiota during cervical carcinogenesis in women with human papillomavirus infection. **PLoS One**, v. 15, n. 9, e0238705, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0238705.

SHULZHENKO, N. et al. Ménage à trois: an evolutionary interplay between human papillomavirus, a tumor, and a woman. **Trends Microbiol.**, v. 22, p. 345–353, 2014. DOI: 10.1016/j.tim.2014.02.009.

TACHEDJIAN, G. et al. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. **Res. Microbiol.**, v. 168, p. 782–792, 2017. DOI: 10.1016/j.resmic.2017.04.001.

TORTELLI, B. A. et al. Characterization of the vaginal microbiome of postmenopausal patients receiving chemoradiation for locally advanced cervical cancer. **JCI Insight**, v. 10, n. 6, e176839, 2025. DOI: 10.1172/jci.insight.176839.

TOSADO-RODRÍGUEZ, E. et al. Inflammatory cytokines and a diverse cervicovaginal microbiota associate with cervical dysplasia in a cohort of Hispanics living in Puerto Rico. **PLOS ONE**, v. 18, n. 12, e0284673, 2023. DOI: 10.1371/journal.pone.0284673.

TYSSEN, D. et al. Anti-HIV-1 activity of lactic acid in human cervicovaginal fluid. **mSphere**, v. 3, e00055–18, 2018.

USYK, M.; ZOLNIK, C. P.; CASTELO, P. E. C.; HERRERO, R.; GRADISSIMO, A.; et al. Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study. **PloS Pathog.** v.16, p. e1008376, 2020. doi: 10.1371/journal.ppat.1008376

VAN DE WIJGERT, J. H. H. M.; JESPERS, V. The global health impact of vaginal dysbiosis. **Res. Microbiol.**, v. 168, p. 859–864, 2017. DOI: 10.1016/j.resmic.2017.02.003.

VINOKUROVA, S. et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. **Cancer Res.**, v. 68, n. 1, p. 307–313, 2008.

WALSH, D. M.; HOKENSTAD, A. N.; CHEN, J.; SUNG, J.; JENKINS, G. D.; CHIA, N.; et al. Postmenopause as a key factor in the composition of the Endometrial Cancer Microbiome (ECbiome). **Sci. Rep.**, v. 9, p. 19213, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-55756-6.

WANG, Z. et al. Altered diversity and composition of the gut microbiome in patients with cervical cancer. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 40, 2019. DOI: 10.1186/s13568-019-0763-z.

- WANG, Z. et al. The diversity of vaginal microbiota predicts neoadjuvant chemotherapy responsiveness in locally advanced cervical cancer. **Microbial Ecology**, v. 84, n. 1, p. 302–313, 2022. DOI: 10.1007/s00248-021-01800-0.
- WU, M.; GAO, J.; WU, Y.; LI, Y.; CHEN, Y.; ZHAO, F.; et al. Characterization of vaginal microbiota in Chinese women with cervical squamous intra-epithelial neoplasia. **Int. J. Gynecol Cancer**, v.30, p. 1500–1504, 2020. doi: 10.1136/ijgc-2020-001341
- WEN, Q.; WANG, S.; MIN, Y.; LIU, X.; FANG, J.; LANG, J.; CHEN, M. Associations of the gut, cervical, and vaginal microbiota with cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. **BMC Womens Health**, v. 25, p. 65, fev. 2025. DOI: 10.1186/s12905-025-03599-1.
- WHITE, B. A.; CREEDON, D. J.; NELSON, K. E.; WILSON, B. A. The vaginal microbiome in health and disease. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 22, p. 389–393, 2011. DOI: 10.1016/j.tem.2011.06.001.
- XIA, Y.; SUN, J.; CHEN, D. Community diversity measures and calculations. In: Statistical Analysis of Microbiome Data with R. **Singapore: Springer Singapore**, p. 167–190, 2018.
- YANG, Q.; WANG, Y.; WEI, X.; ZHU, J.; WANG, X.; XIE, X.; et al. The alterations of vaginal microbiome in HPV16 infection as identified by shotgun metagenomic sequencing. **Front. Cell Infect. Microbiol**, v.10, p. 286, 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.00286
- YUAN, D. et al. The European Nucleotide Archive in 2023. **Nucleic Acids Research**, p. gkad1067, 2023.
- ZHOU, L. et al. O sequenciamento de leitura longa revela a integração do HPV de alta resolução e sua progressão oncogênica no câncer cervical. **Nat Commun.**, v. 13, n. 1, p. 2563, 2022.
- ZHU, X. X. et al. The potential effect of oral microbiota in the prediction of mucositis during radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. **EBioMedicine**, v. 18, p. 23–31, 2017. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.02.002.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.