

---

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

**Caracterización de la microbiota vaginal en pacientes VPH positivo mediante el análisis bioinformático de secuencias 16s ARN y su influencia en el riesgo, protección y persistencia del contagio por VPH.**

Realizado por:

**RICARDO PAÚL TELLO GALLEGOS**

Director del proyecto:

**Ing. Jorge Espinosa Espinosa PhD (c)**

Como requisito para la obtención del título de:

**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

Quito, 10 de abril de 2024

---

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**DECLARACIÓN JURAMENTADA**

Yo, RICARDO PAÚL TELLO GALLEGOS, con cédula de identidad 1717768608, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

**FIRMA Y CÉDULA**

**1717768608**

**DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**Caracterización de la microbiota vaginal en pacientes VPH positivo mediante el análisis bioinformático de secuencias 16s ARN y su influencia en el riesgo, protección y persistencia del contagio por VPH.**

Realizado por:

**RICARDO PAÚL TELLO GALLEGOS**

como Requisito para la Obtención del Título de:

**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

ha sido dirigido por:

**Ing. Jorge Espinosa Espinosa PhD (c)**

Quien considera que constituye un trabajo original de su autor

**FIRMA DIRECTOR**

---

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

Los Profesores Informantes:

**Ing. Manuel Andrés Herrera, MSc.**

**Dra. Delia Calderón**

Después de revisar el trabajo presentado,  
lo han calificado como apto para su defensa oral  
ante el tribunal examinador

**FIRMA**  
**Ing. Manuel Andrés Herrera, MSc.**

**FIRMA**  
**Dra. Delia Calderón**

Quito, 10 de abril de 2024

**DEDICATORIA**

A Jesucristo,  
Con tu amor incondicional siempre serás mi guía y mi horizonte.  
¡Contigo todo, sin ti nada!

A mi gran amor, me siento bendecido por tu constante apoyo, inspiración y amor incondicional en este paso académico. A mi amada hija, Paulette. Eres mi mayor alegría, mi motivación más poderosa y mi razón para nunca darme por vencido.

A Mamá. Mi roca, mi fortaleza y mi puerto seguro.  
A Papá. ¡Indudablemente el tiempo es perfecto!

¡Lo logramos nuevamente!

**AGRADECIMIENTO**

A mi hermana Gabriela, eres luz en mis momentos oscuros, eres paz en mis momentos de guerra y mi refugio cuando todo se convierte en incertidumbre.  
¡Mi eterna gratitud y amor! Danny, Juan José, Isabela y Juan Felipe.

A mi gran amigo Jaime Gia, indiscutiblemente tu sabiduría no solamente abriga a las personas que te rodean.  
¡Cambian el mundo!

“Imposible nada es. Difícil, muchas cosas son.” — Yoda

Este trabajo no hubiera sido posible sin Jorge y Andrés quienes con su cariño, paciencia y tenacidad redimieron sobre mí sus conocimientos y apoyo total a este proyecto aportando a la ciencia en nuestra querida Universidad Particular Internacional SEK.

"Life is wonderful if you're not afraid of it." - Marie Curie



# Caracterización de la microbiota vaginal en pacientes VPH positivo mediante el análisis bioinformático de secuencias 16s ARN y su influencia en el riesgo, protección y persistencia del contagio por VPH

Ricardo Tello<sup>1, \*</sup>, Andrés Herrera<sup>1</sup> and Jorge Espinosa<sup>1 2 3 4</sup>

<sup>1</sup> Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, UISEK

<sup>2</sup> Experimental and Applied Biomedicine Research Group, Health Sciences Faculty, Universidad Particular Internacional SEK (UISEK), Quito 170302, Ecuador.

<sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), 46010 Valencia, Spain.

<sup>4</sup> University Research Institute for Biotechnology and Biomedicine (BIOTECMED), Universidad de Valencia, Valencia, Spain

\* Autor de Correspondencia: [ricardo.tello@uisek.edu.ec](mailto:ricardo.tello@uisek.edu.ec); Tel.: +593 987 86 9889

**Resumen:** La infección causada por el virus del papiloma humano (VPH) es una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuentes, pertenece al grupo de virus oncogénicos potencialmente cancerígeno. La microbiota se desarrolla como un determinante que podría influir en el equilibrio aumentando o disminuyendo la evolución y capacidad de promoción de infecciones virales. La homeostasis microbiana del aparato reproductor femenino mantiene el equilibrio de las comunidades bacterianas que funcionan como barrera de protección frente a infecciones causadas por microorganismos patógenos. Los cambios en la microbiota altera el microambiente cérvico – vaginal permitiendo la persistencia, proliferación y desarrollo de cáncer frente a la infección por VPH. Sin embargo, la composición microbiana confluyente de diferentes regiones geográficas y su asociación con diferentes tipos de la infección por VPH no se han reportado. El presente estudio pretende identificar la microbiota cérvico – vaginal mediante el análisis metagenómico de secuencias 16s ARN de diferentes fuentes geográficas y su relación con los tipos de infección por VPH. Se identificaron perfiles microbianos confluentes: *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp., y *Gardnerella* spp. están presentes independientemente del tipo de infección y la fuente geográfica. Se observó mayor diversidad en pacientes negativas para VPH, con un ecosistema más equilibrado y resistente a perturbaciones. Identificamos biomarcadores asociados a los diferentes tipos de infección por VPH, incluyendo *Corynebacterium jeikeium* y *Corynebacterium urealyticum* en infecciones simples. Por otro lado, *Eubacterium limosum* es un potencial biomarcador relevante en la modulación inmunológica ante las infecciones por VPH. Se identificaron marcadores para infecciones múltiples de VPH y los posibles indicadores biológicos de cepas de bajo y alto riesgo de cáncer cervical. La presente investigación demostró la asociación de la ecología microbiana cérvico – vaginal, los tipos de infección por VPH y la búsqueda de biomarcadores como potenciales mecanismos de identificación temprana. Sin embargo, futuras investigaciones requieren la integración de factores socio – demográficos y las limitaciones del análisis metagenómico para una mejor precisión e interpretación de los resultados.

**Palabras clave:** 16s ARN; Microbiota; VPH; Secuenciación; Metagenómica

**Abstract:** Infection caused by the human papillomavirus (HPV) is one of the most frequent sexually transmitted diseases and belongs to the group of potentially carcinogenic oncogenic viruses. The microbiota develops as a determinant that could influence the balance by increasing or decreasing the evolution and promotion capacity of viral infections. The microbial homeostasis of the female reproductive tract maintains the balance of bacterial communities that function as a protective barrier against infections caused by pathogenic microorganisms. Changes in the microbiota alter the cervical-vaginal microenvironment allowing the persistence, proliferation and development of cancer in the face of HPV infection. However, the confluent microbial composition of different geographic regions and its association with different types of HPV infection have not been reported. The present study aims to identify the cervical – vaginal microbiota by metagenomic analysis of 16s RNA sequences from different geographical sources and their relationship with HPV infection types. Confluent microbial profiles were identified: *Lactobacillus* spp, *Prevotella* spp, and *Gardnerella* spp were present regardless of infection type and geographic source. Greater diversity was observed in HPV-negative patients, with a more balanced ecosystem resistant to perturbations. We identified biomarkers associated with different types of HPV infection, including *Corynebacterium jeikeium* and *Corynebacterium urealyticum* in single infections. On the other hand, *Eubacterium limosum* is a potential biomarker relevant to immune modulation in HPV infections. Markers for multiple HPV infections and potential biomarkers of low and high-risk strains for cervical cancer were identified. The present investigation demonstrated the association of cervical microbial ecology, HPV infection types and biomarker search as potential early identification mechanisms. However, future research requires the integration of socio-demographic factors and the limitations of metagenomic analysis for better accuracy and interpretation of the results.

**Keywords:** 16s RNA; Microbiota; VPH; Sequencing; Metagenomics

---

## 1. Introducción

El virus del Papiloma humano (VPH) pertenece a la familia Papillomaviridae, infecta células epiteliales en humanos y otros animales, desencadenando infecciones epiteliales asintomáticas, hiperplasia epitelial benigna o cáncer. Estructuralmente, el VPH es un virus pequeño desnudo, de forma icosaédrica sin envoltura común de 50 a 60 nm de diámetro (Cosper et al., 2021). Dicha envoltura está cubierta por moléculas de proteína L1 encargadas de la interacción con los receptores de la superficie celular del huésped y L2 complementaria a la función de L1, el cual facilita procesos críticos de la infección como la penetración y el ensamblaje nuclear del virus (Aksoy et al., 2017). El VPH es un virus de ADN circular de doble cadena, de 8000 pb, sus viriones se unen a las células epiteliales produciéndose infecciones productivas o latentes (Bruni L et al., 2023). En las infecciones productivas o activas, la reproducción viral se da en las células escamosas del huésped produciendo cambios celulares como coilocitosis, disqueratosis, atipia nuclear o multi nucleación, mientras que, la infección latente se produce en las células inmaduras del epitelio, en donde el virus queda latente dentro de la célula. Se han descrito alrededor de 200 tipos de VPH, los cuales, se clasifican por su potencial oncogénico, se dividen en dos categorías: "alto riesgo" (AR-VPH) a aquellas cepas con alta probabilidad de promover la aparición de tumores en el cuello uterino y su progresión a lesiones precancerosas; mientras que, las cepas denominadas de bajo riesgo (BR-VPH) están asociadas a una interacción deficiente con los mecanismos de daño y estrés celular, generando verrugas genitales sin riesgo de progresión a cáncer (Dareng et al., 2016).

La microbiota vaginal es una comunidad compleja de microorganismos que reside en la vagina. Está compuesta por bacterias, virus y hongos. Su composición es dinámica y puede variar según diversos factores, como la edad, el ciclo menstrual, el uso de anticonceptivos, hormonas, la higiene íntima y las infecciones, además del origen étnico y factores socioculturales. Las bacterias más comunes son *Lactobacillus* spp., que desempeñan un papel crucial en la subsistencia de un ambiente vaginal saludable (Liu et al., 2022).

La microbiota de la cavidad vaginal juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis del aparato reproductor femenino ya que cuando se encuentra en equilibrio mantiene la integridad del epitelio vaginal y previene la colonización excesiva de microorganismos nocivos (Ravel et al., 2011). Se ha descrito que la composición de la microbiota cérvico – vaginal puede estar asociada con el riesgo de adquirir una infección por VPH, dicho riesgo se ve asociado a la presencia o ausencia mayoritaria de *Lactobacillus crispatus* el cual cumple como factor de protección, mientras que, *Lactobacillus iners* o *Gardnerella vaginalis* se han presentado como factores de riesgo de contraer dicho virus (Chen et al., 2021). Otro estudio discute la hipótesis donde la diversidad bacteriana menos dominada por *Lactobacillus* spp., tiene un mayor riesgo de adquirir una infección persistente por VPH (Lee et al., 2013). Se ha sugerido que la composición de la microbiota vaginal puede influir en la carga viral del VPH en mujeres infectadas; una microbiota vaginal colonizada por *Lactobacillus* spp. podría estar asociada con una menor carga viral de VPH en comparación con una diversidad sujeta por otras comunidades bacterianas (Berg et al., 2020).

Los microorganismos presentes en la vagina pueden variar en dependencia de la edad y la condición fisiológica de la mujer. En la menarquia y menopausia el pH de la cavidad vaginal es superior al pH de la etapa fértil de la mujer adulta, esta se encuentra entre 3,8 – 4,5 y se ha relacionado con una mayor abundancia de *Lactobacillus* spp. (Elizabeth et al., 2018). El tracto genital inferior (TGI) de las mujeres adultas sanas en edad fértil presentan en su microbiota una incidencia del 68% de *Lactobacillus* spp. 78% de micoplasmas, 45% de *Gardnerella vaginalis* y un 12% de *Candida* spp. El microbioma juega un rol estelar en el funcionamiento y la homeostasis integral del tracto vaginal, se han identificado ciertas *Community State Types* (CST) que se diferencian por su capacidad protectora contra infecciones y disfunciones. Dichas CST se diferencian por su nivel de protección el cual se mide según el valor numérico de Nunget; valores de 0 a 3 indican una mayor protección y han sido asociadas con comunidades de Lactobacilos dominantes, mientras que, valores superiores a 3 sugieren una menor protección y mayor diversidad bacteriana, aumentando el riesgo de disfunción vaginal (Elovitz et al., 2019).

A partir del uso de la bioinformática y la metagenómica se han desarrollado líneas de investigación enfocadas en la microbiota humana y la dinámica poblacional de las comunidades bacterianas. La capacidad de procesamiento de grandes cantidades de datos biológicos, en particular, la secuenciación del 16s ARN ha permitido inferir las relaciones filogenéticas entre los organismos procarotas, acelerando los avances en la caracterización y composición bacteriana en diferentes regiones del cuerpo humano (Bermudez-Santana, 2016). Sin embargo, estas investigaciones no han profundizado en el impacto de la dinámica microbiana en los procesos de diagnóstico temprano de enfermedades de transmisión sexual, como el VPH (Singer et al., 2021). Por lo tanto, el presente estudio pretende evaluar la composición de la microbiota cérvico - vaginal de mujeres en diferentes fuentes geográficas y su asociación con los diferentes tipos de infección por VPH, factores de riesgo, protección y la persistencia de la infección.

## 2. Materiales y métodos

### Estrategia de búsqueda, criterios de inclusión y exclusión

Se realizó una búsqueda sistemática incluyendo estudios publicados entre el 2010 y 2023, en las bases de datos PubMed, Web of Science, Scopus y Sequence Read Archive (SRA). Se usaron las palabras clave y términos controlados para “VPH”, “microbiota”, “cérvico – vaginal”, “16s ARN”. Los criterios de inclusión para los estudios elegibles fueron: Estudios centrados en (I) la evaluación de la microbiota cérvico – vaginal y el VPH de bajo y alto riesgo de cáncer cérvico uterino; (II) las muestras clínicas deben ser pruebas ginecológicas de Papanicolau, (III) ser estudios de secuenciación de fragmentos de amplicones 16s ARN; (IV) los datos deben incluir controles de pacientes negativos para VPH; (V) tener datos sin procesar disponibles públicamente sin necesidad de requerir autorización de los autores principales. Dado a que los datos de análisis son públicos a partir de publicaciones conocidas, no se requirió del consentimiento de pacientes ni la revisión de un comité de bioética institucional.

### **Análisis de secuencias y caracterización de la microbiota vaginal**

Se realizó un análisis metagenómico *in silico* dirigido al 16s ARN proveniente de muestras individuales de hisopados cérvico – vaginales. Para el análisis correspondiente, las secuencias seleccionadas se clasificaron según la base de datos de consulta y el tipo de secuenciación obtenida; el procesamiento de secuencias utilizó la interfaz de análisis bioinformático Galaxy versión 23.2.1. Para los datos *paired end* 16s ARN se identificaron muestras de VPH negativo (- VPH), Infección simple por VPH (S – VPH), Infección múltiple por VPH (M – VPH), Infecciones de alto riesgo (AR – VPH), Infecciones de bajo riesgo (BR – VPH); y para las muestras *single end* se identificaron a muestras de VPH negativo (-VPH) y VPH positivo (+VPH). Para cargar las secuencias en la plataforma Galaxy Australia se utilizó la herramienta Sequence Read Archive Download and Extract reads in FASTQ en donde se ingresaron los códigos de acceso de cada base de datos (Leinonen et al., 2011). Los datos que requirieron un proceso de análisis agrupado, se concatenaron con la herramienta Concatenate Multiple Data Sets; posteriormente se realizó el proceso de alineamiento contra el genoma humano Hg38 utilizando la herramienta Bowtie2 (Langmead et al., 2009; Langmead & Salzberg, 2012).

Los datos no alineados con el genoma humano Hg38 se utilizaron para la identificación y etiquetado de las asignaciones taxonómicas por sus siglas en inglés (*Operational Taxonomic Units*) OTUs utilizando la herramienta Kraken2 (Wood & Salzberg, 2014) mediante una alineación precisa de K-mers y métodos de base de datos optimizados. La identificación y asignación de los OTUs se realizó equiparando la base de datos miniKraken2 v2-2020. Dichos datos se utilizaron para la visualización en porcentaje de la abundancia de los microorganismos. La visualización requirió de la herramienta krona pie Chart (Cuccuru et al., 2014; Ondov et al., 2011) y consecuentemente para la segmentación y diferenciación gráfica se utilizó la herramienta Pavian (Breitwieser & Salzberg, 2020).

### **Diversidad Microbiana y búsqueda de marcadores biológicos**

El reporte proveniente de miniKraken2 se cargó en la plataforma Galaxy Trakr, con la herramienta Vegan Abundance se obtuvo el porcentaje de abundancia relativa por cada especie identificada. Este reporte permitió obtener el índice de diversidad media de especies por cada base de datos utilizando la herramienta Kraken Tools Calculate Alpha Diversity según los índices de Shannon´s, Fisher, Simpson´s y Berger – Parker´s Alpha (Lu et al., 2022).

Para la identificación de marcadores biológicos de interés se analizó los conjuntos de comunidades microbianas seleccionadas en relación con el tipo de infección, para ello, se compararon los diferentes tipos de infección utilizando teoría de conjuntos con el uso del Suite de análisis estadístico RStudio.

Para encontrar los marcadores biológicos se utilizó la siguiente formula (1):

$$[(S - VPH \cap M - VPH) \cup (-VPH)] \quad (1)$$

## **3. Resultados**

### **Selección de estudio**

Los detalles del proceso de búsqueda y la selección de bases de datos de las secuencias analizadas se resumen en la Tabla 1. Se identificaron tres bases de datos provenientes de Asia (China), América (México) y Europa (Italia) las cuales se diferenciaron en relación con el tipo de infección por VPH. Se identificaron 61 lecturas crudas de pacientes diagnosticadas -VPH (*Healthy*); 46 lecturas crudas de pacientes diagnosticadas con S – VPH; 38 secuencias crudas de pacientes M – VPH y 54 secuencias crudas de pacientes diagnosticadas con VPH positivo sin clasificación del tipo de VPH.

**Tabla 1.** Características de los estudios incluidos categorizados por fuente geográfica y tipo de infección.

Autor, Año	País	Diseño	Estudio de Población	Tipo de Muestra	Plataforma y Tipo de Secuenciación
(Liu et al., 2022)	China	Caso – Control	S – VPH M – VPH AR – VPH BR – VPH	Papanicolau	Secuenciación de amplicones Illumina MiSeq
(López-Fillooy et al., 2022)	México	Caso – Control	S – VPH M – VPH AR – VPH BR – VPH	Papanicolau	Secuenciación de amplicones Illumina MiSeq
(Di Paola et al., 2017)	Italia	Caso – Control	+VPH -VPH	Papanicolau	Secuenciación de amplicones Piro secuenciación 454

### Composición de la microbiota cérvico – vaginal

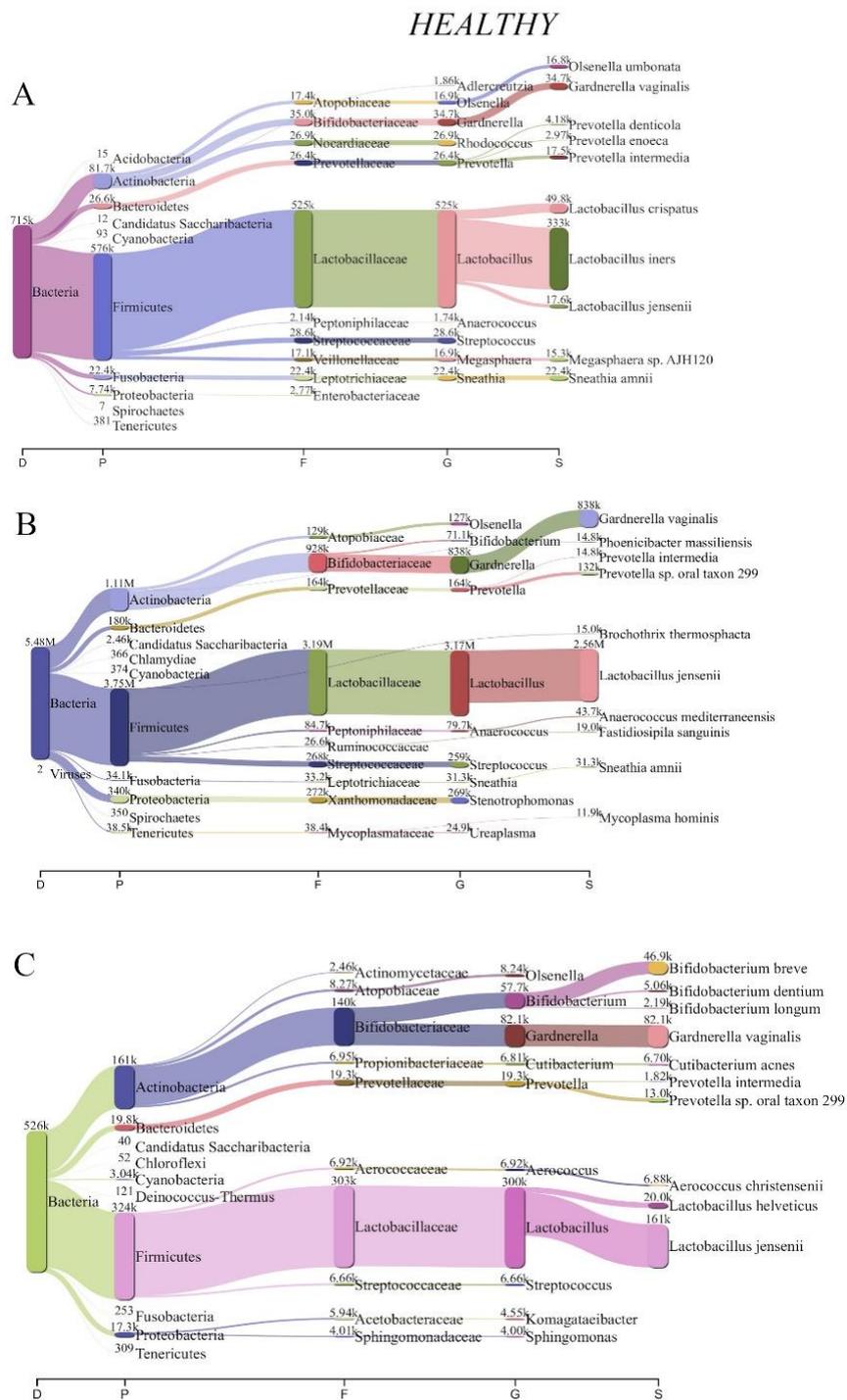
Se obtuvo la comparación de la riqueza bacteriana general y la composición filogenética de la microbiota cérvico – vaginal en pacientes diagnosticados con infección por S – VPH, M – VPH y *Healthy* respectivamente. La composición de la microbiota cérvico – vaginal muestra una alta diferencia entre el tipo de infección y la fuente geográfica de los datos analizados (Figura 1).

Se observa que en la condición *Healthy* (Figura 2) indica que, a nivel de género, *Lactobacillus* spp. presentó un mayor porcentaje de lecturas tanto en China, México e Italia. Así como el género *Gardnerella*, *Streptococcus* o *Prevotella* aparecen en el 80% de las secuencias de las bases de datos analizadas; mientras que, a nivel de especie: *Lactobacillus iners* y *jensenii* están presentes en todas las bases de datos, considerándose un factor común de la microbiota cérvico – vaginal estudiada.

Las infecciones S – VPH (Figura S1) muestran la presencia de *Olsenella* spp., *Gardnerella* spp., *Prevotella* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. y *Sneathia* spp. tanto en China como en México; sin embargo, existen diferencias como la ausencia de *Chlamydiae* a nivel de *Phylum* en México y la presencia de *Prevotella jejuni* y *Prevotella scopos* a nivel de especie en China.

En las infecciones M – VPH (Figura S2) existen similitudes nivel de género por *Olsenella* spp., *Prevotella* spp., *Lactobacillus* spp., *Megasphaera* spp. y *Sneathia* spp. Por otro lado, existen diferencias a nivel de especie: en China existen especies como *Olsenella umbonata*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners* y *Veionella rodentium* las cuales no se identificaron en México. En contraste, México presenta especies como *Prevotella sp. Oral taxon 99*, *Ezakiella massiliensis*, *Parvimonas micra* y *Fastidiospila sanguinis* de las cuales no se encontraron en China.

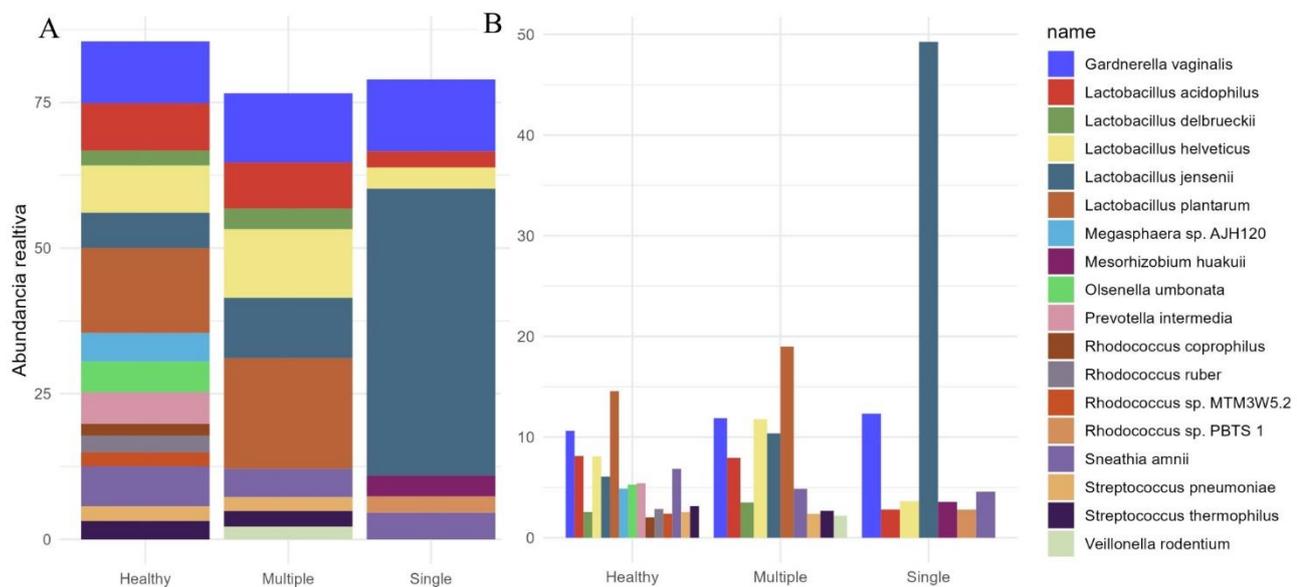
Por último, a nivel de especie en las secuencias + VPH provenientes de Italia (Figura S3) se encontró mayor cantidad de lecturas vinculado a la presencia de *Bifidobacterium breve*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus herlveticus* y *Lactobacillus jensenii*. La importancia de la identificación de las especies por cada tipo de infección permitió identificar los parámetros de búsqueda de marcadores biológicos vinculados al tipo y estadio de la enfermedad ocasionada por la infección del VPH.



**Figura 2.** Representación Sankey de caracterización microbiana: Porcentaje de lecturas metagenómico a nivel de familia, género y especie observado en dependencia del tipo de infección y el origen geográfico de las secuencias A) China B) México C) Italia

Para complementar el análisis de composición microbiana se evaluaron los porcentajes de abundancia relativa a nivel de especie. En China, las infecciones S-VPH presentan una mayor abundancia de *Lactobacillus jensenii* en relación a infecciones M – VPH o -VPH bajo un umbral de análisis mayor al 2% (Figura 3). Por otro lado, *Prevotella intermedia* se observa únicamente en -VPH y por último la presencia de *Gardenella vaginalis* se encuentra presente en abundancias equivalentes independientemente del tipo de infección y su fuente geográfica.

En México. *Lactobacillus jensenii* presenta una mayor abundancia en pacientes -VPH en comparación con pacientes M – VPH y S – VPH respectivamente (Figura S4). *Streptococcus pneumoniae* y *Legionella pneumophila* son especies que únicamente se encuentran en pacientes S – VPH o M – VPH. En el caso de Italia (Figura S5) no existen diferencias significativas de abundancia entre especies como *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus helveticus*; sin embargo, especies como *Escherichia coli* se encuentran únicamente en pacientes +VPH.



**Figura 3.** Análisis de abundancia relativa y composición de la microbiota cérvico – vaginal en dependencia del tipo de infección por VPH a nivel de especie; base de datos: China. A) Representación de barra compacta de las comunidades bacterianas identificadas: M – VPH, S – VPH y -VPH (Healthy), B) Diagrama de barras de las comunidades bacterianas identificadas: M – VPH, S – VPH y -VPH (Healthy).

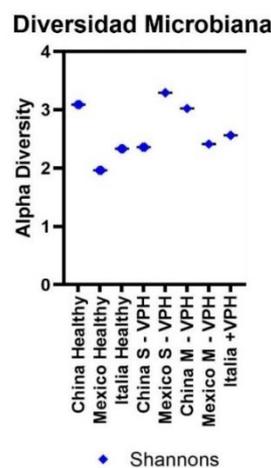
**Diversidad microbiana**

El estudio de diversidad alfa, se realizó para comprender la variabilidad microbiana dentro del ecosistema cérvico - vaginal. Se obtuvo el análisis de riqueza de especies en dependencia de las fuentes geográficas y el tipo de infección por VPH. Los índices de diversidad utilizados incluyeron el índice de Shannon, que mide la riqueza y equidad de especies; el índice de Berger-Parker, que se centra en la abundancia relativa entre especies; el índice de Simpson, que evalúa la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie; y por último el índice de Fisher, una medida integral de diversidad (Tabla 2).

**Tabla 2.** Diversidad Alfa de la microbiota cérvico – vaginal a nivel de especie.

Diversidad Alfa	Healthy		S - VPH		M - VPH		+VPH	
	China	México	Italia	China	México	China		México
Shannon’s	3,09	1,96	2,33	2,36	3,29	3,02	2,41	2,56
Berger Parker’s	0,15	0,56	0,32	0,49	0,21	0,19	0,45	0,26
Simpson’s	0,93	0,66	0,83	0,73	0,92	0,91	0,77	0,84
Fisher índice	917	3.007,8	989,57	1.945,4	3.381,7	1.261	2.440,6	1.940,9

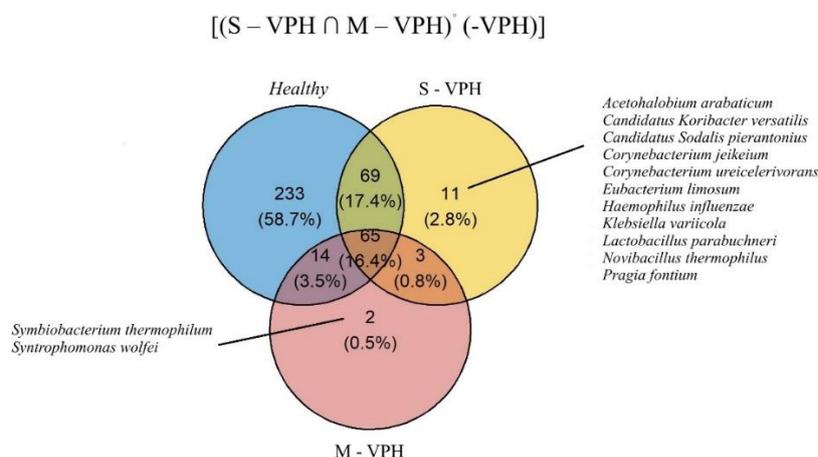
Las muestras -VPH muestran que la diversidad es variada en comparación con la diversidad microbiana en los diferentes tipos de infección. China es la población con mayor diversidad bajo los índices de Shannon, Simpson y Fisher; por otro lado, los pacientes -VPH provenientes de Italia tienen mayor variabilidad de las especies microbianas, las cuales presentan una mayor dominancia en su comunidad (Tabla 2). Los pacientes S - VPH provenientes de México tienen un valor equivalente a la diversidad de los pacientes M – VPH provenientes de China bajo el índice de Shannon, explicando que los valores más altos reflejan una mayor diversidad de especies y distribución equitativa entre ellas (Figura 4). Por último, el análisis de diversidad alfa de las muestras +VPH provenientes de Italia muestran un valor medio entre las infecciones S – VPH y M – VPH resultando una diversidad más variada y con una distribución más equilibrada dentro de su comunidad (Figura S6).



**Figura 4.** Diversidad alfa microbiana bajo el índice estadístico de Shannon en las diferentes regiones (China, México e Italia) y el tipo de infección por VPH.

### Selección de Marcadores Biológicos

Con la finalidad de identificar especies que pudieran utilizarse como marcadores biológicos de los tipos de infección por VPH se obtuvo el producto de la intersección ( $\cap$ ) del tipo de infecciones simples e infecciones múltiples y la unión ( $\cup$ ) con las especies de pacientes – VPH. El análisis identificó que para infecciones S - VPH se consideran 11 especies de interés: *Acetohalobium arabaticum*, *Candidatus Koribacter versatilis*, *Candidatus Sodalis pierantonius*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium ureicelerivorans*, *Eubacterium limosum*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella variicola*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Novibacillus thermophilus*, *Pragia fontium*; mientras que para infecciones múltiples de VPH se consideran 2 especies de interés: *Symbiobacterium thermophilum*, *Syntrophomonas wolfei* (Figura 5).



**Figura 5.** Análisis comparativo de conjuntos de especies consenso independientes de la fuente geográfica; especies de interés entre infecciones simples de VPH, infecciones múltiples de VPH y pacientes – VPH.

#### 4. Discusión

Actualmente las infecciones por VPH son una causa significativa en el desarrollo de cáncer cérvico uterino y mortalidad a nivel mundial, a pesar de la existencia de mecanismos de prevención y vacunación (Casper et al., 2021). Por esta razón, la evolución de las infecciones por VPH y sus diversos genotipos son de gran interés clínico. Estudios previos han detallado que las mujeres infectadas con múltiples cepas de VPH tienen una mayor probabilidad de sufrir lesiones y cáncer cervical (Hildesheim et al., 2001). En la presente, evaluamos los perfiles microbianos a partir de secuencias 16s ARN en tres contextos geográficos diferentes (China, México e Italia). Nuestros resultados indican que, a nivel de género, las especies *Lactobacillus* spp. *Prevotella* spp. y *Gardnerella* spp. están presentes en la microbiota vaginal, independientemente de la presencia o ausencia de infección por VPH. Esto concuerda con el trabajo de Ahire y colaboradores, quienes describen el papel protector de la microbiota vaginal frente a las infecciones de transmisión sexual.

Los *Community State Types* (CST) clasifican a los diferentes tipos de microbiota vaginal basándose en la composición microbiana predominante. Los CST I, II, III, V están dominados por las especies de Lactobacilos, los cuales, además de producir compuestos que inhiben el crecimiento de patógenos ayudan a estimular la producción de citoquinas antiinflamatorias (Ashique et al., 2023). Por otro lado, *Prevotella* y *Gardnerella* se asocian con el CST IV, el cual no contiene una cantidad significativa de Lactobacilos, pero se encuentra compuesta por una mezcla polimicrobiana considerada como un factor de riesgo ante la presencia de virus como el VPH (Borgogna et al., 2020; Juárez et al., 2020). Esta información concuerda con nuestros resultados reflejados en la Figura S1 y S2. No obstante, Martín y colaboradores en 2008 indica que la presencia y abundancia bacteriana puede variar en dependencia de distintos factores, incluyendo la edad, estado hormonal y diferentes parámetros demográficos. Por lo que, es necesario destacar que aun existiendo microorganismos en la microbiota vaginal normal, un desequilibrio en su abundancia relativa puede tener diferentes implicaciones dentro de la salud reproductiva y en la interacción con patógenos como el VPH (Fang et al., 2022; Restrepo Arenas et al., 2021).

Los índices de diversidad alfa indican que, en nuestro estudio sin importar la procedencia geográfica de los datos, la microbiota de los pacientes *Healthy* exhibe una marcada diversidad y equidad de especies, tal como se evidencia en los índices de Shannon, Simpson y Berger-Parker (Figura S6). Específicamente, el índice de Shannon (Figura 4), que considera tanto la riqueza de especies como su equidad, muestra valores más elevados en los pacientes considerados sanos, lo que determina una distribución más uniforme de las especies concordando con los resultados obtenidos por Casper y colaboradores en donde se resalta que existe una relación entre la infección por VPH y la variabilidad de bacterias específicas en el microambiente vaginal. Del mismo modo, el índice de Berger-Parker, que evalúa la dominancia de la especie más abundante, indica una menor dominancia de una sola especie en el grupo de individuos sanos (Madi et al., 2020). Morris y colaboradores en 2014) sugieren que un ecosistema más equilibrado es posiblemente más resistente a las perturbaciones del ecosistema de la microbiota cérvico – vaginal coincidiendo con los resultados obtenidos en tanto las S – VPH como M – VPH, que muestran un contraste hacia una menor diversidad y equidad de especies con un ecosistema menos equilibrado y más propenso al desarrollo y propagación del virus del papiloma humano.

Los marcadores biológicos seleccionados en este estudio se asocian con la presencia específica de ciertas especies bacterianas para cada tipo de infección. Entre estas especies se encuentran *Corynebacterium jeikeium* y *Corynebacterium ureicelerivorans*, bacterias que se han asociado principalmente con infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, en este estudio, estas bacterias se asocian con infecciones simples por VPH. Este hallazgo se corrobora con el estudio de Manzaneres-Leal y colaboradores en 2021, quienes reportaron los cambios que sufre la microbiota de pacientes que recibían quimioterapia, radioterapia o braquiterapia como tratamiento para el cáncer cervical y que están relacionadas a infecciones por genotipos de VPH considerados de alto riesgo (Chacón et al., 2006).

Se ha identificado a *Eubacterium limosum* como una bacteria con potencial para modular la respuesta inmune. Un estudio realizado en la Universidad de Illinois publicado en 2024 evaluó el comportamiento de la microbiota humana frente a infecciones y cáncer. Este estudio reveló que la presencia de *Eubacterium limosum* podría formar parte de la inmunomodulación tanto local como sistémica, mejorando el reclutamiento de células T CD8 e IFN $\gamma$ , y disminuyendo así la señalización de procesos inflamatorios. Por lo tanto, en este estudio, la presencia de esta especie en el tracto cérvico-vaginal, las infecciones simples por VPH y su modulación inmunológica serían de gran interés para futuras investigaciones (Roy & Singh, 2024).

La investigación llevada por Constantin y colaboradores en 2023 estudió las implicaciones de la disbiosis oral y las infecciones por VPH, encontrando a *Haemophilus influenzae* como un biomarcador distintivo en pacientes contagiados por AR – VPH y el desarrollo de cáncer orofaríngeo, bajo esta premisa nuestro estudio representa a *Haemophilus influenzae* como un posible biomarcador de infecciones S – VPH y de cepas de AR - VPH. Por otro lado, se ha reportado la presencia de *Haemophilus influenzae* en vulvovaginitis producto de las infecciones de transmisión sexual relacionadas a las diferentes prácticas sexuales determinadas como uno de los factores de riesgo. Nuestro estudio no considero las relaciones demográficas de la población de estudio, el vínculo con las infecciones por VPH y la presencia de *Haemophilus influenzae* en la cavidad cérvico – vaginal. Mpho en 2022 identificó previamente a *Klebsiella varicola* en la microbiota cérvico – vaginal de pacientes infectados por cepas de AR – VPH sin presencia de coinfecciones por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), en nuestro estudio este resultado podría ser categorizado como un biomarcador de la presencia de cepas de AR – VPH en infecciones S – VPH. En las comunidades bacterianas estudiadas existe una relación entre una menor abundancia de *Lactobacillus* spp. y una mayor presencia de bacterias anaerobias. Entre estas especies se incluyen a *Gardnerella* spp., *Megasphaera* spp., *Sneathia* spp. y *Prevotella* spp., coincidiendo con Brotman, Oh y colaboradores quienes categorizan a estas especies dentro del grupo CST IV asociada a una mayor gravedad de la enfermedad, mayor persistencia de la infección y comúnmente asociada con el desarrollo de neoplasia intracervical.

En la vagina de las mujeres en edad reproductiva, se estima que alrededor del 80% de microorganismos pertenecen al género *Lactobacillus* spp. Estos lactobacilos aportan al mantenimiento de un pH bajo y produciendo componentes bacteriocinas. Se ha descrito que *Lactobacillus* spp. produce enzimas capaces de fermentar el glucógeno presente en el epitelio cervical y la cavidad vaginal cuando hay presencia de estrógenos, lo que resulta en una homeostasis vaginal basada en la producción de cantidades apropiadas de ácido láctico. Esta producción ácida favorece la barrera de protección de la mucosa vaginal contra infecciones por microorganismos como el VPH (Zeng et al., 2023). Aunque no se ha documentado la presencia de *Lactobacillus parabucherni* en la cavidad vaginal ni su relación con las infecciones ocasionadas por VPH, es importante considerar que estudios como el realizado por Martínez-Peña y colaboradores en 2020 muestran que una microbiota no colonizada por lactobacilos productores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene 15 veces más de probabilidad de desarrollar vaginosis bacteriana. Por lo tanto, la investigación desarrollada por la universidad de Milán sugiere que la administración de *Lactobacillus crispatus* como probiótico promueve la eliminación de la infección viral del VPH (DI PIERRO et al., 2021).

En este estudio se encontró la presencia de *Syntrophomonas wolfei* y a *Symbiobacterium thermophilum* como un biomarcador para infecciones M – VPH. Estas especies pertenecen al grupo de bacterias anaerobias, lo que significa que puede sobrevivir y crecer en ambientes carentes de oxígeno (Murdoch, 1998). La cavidad vaginal puede presentar condiciones anaeróbicas, especialmente durante una infección, permitiendo que estas especies puedan establecerse y proliferar en la microbiota cérvico – vaginal; sin embargo, no está relacionada con la presencia de cepas de AR – VPH.

En esta investigación metagenómica exploramos la complejidad de la microbiota cérvico – vaginal de tres fuentes geográficas diferentes y su interacción con el VPH. Los resultados revelan que la presencia de *Acetohalobium arabaticum*, *Candidatus Koribacter versatilis*, *Candidatus Koribacter versatilis*, *Candidatus Koribacter versatilis* se pueden relacionar como posibles marcadores moleculares de S – VPH, las cuales podrían ser indicadores del contagio de cepas de bajo riesgo de cáncer cérvico uterino (BR – VPH) o cepas de alto riesgo de cáncer cérvico uterino (AR – VPH). Estas especies no se han reportado previamente.

Por último, es importante destacar que la metagenómica presenta limitaciones, como la calidad de las secuencias obtenidas en las bases de datos, el sesgo de la genotipificación por PCR y la complejidad de las comunidades bacterianas evaluadas en dependencia de un solo gen (16s ARN) (Ravel et al., 2011). Finalmente, el presente estudio no incluyó en su análisis los diferentes factores socio – demográficos como la edad, estado civil, educación, ocupación, prácticas sexuales, uso de anticonceptivos, uso de alcohol o drogas, higiene personal, acceso a la salud, dieta, estilo de vida, etc. Es por ello que, la omisión de estos factores socio – demográficos pueden determinarse como factores de confusión y lo que podría distorsionar la medida de asociación entre las variables de estudio (Brotman et al., 2014; Quince et al., 2017).

## 5. Conclusiones

Este estudio destaca la importancia de la composición de la microbiota cérvico – vaginal y la susceptibilidad de la infección por VPH, evidenciando que una microbiota dominada por *Lactobacillus* spp., se asocia con protección, mientras que, una mayor presencia de *Prevotella* y *Gardnerella* indica susceptibilidad. El análisis bioinformático revela diferencias significativas en la diversidad microbiana entre los individuos *Healthy* y aquellos con infecciones S – VPH o M – VPH, subrayando la relevancia de la diversidad y equilibrio de la microbiota en la prevención de la infección y propagación del virus. Estos hallazgos sugieren que el mantenimiento de una microbiota vaginal equilibrada podría ser clave en la lucha contra las infecciones por VPH.

El presente análisis destaca la importancia de identificar marcadores biológicos específicos asociados a la disbiosis de la microbiota vaginal. Los hallazgos subrayan el papel de *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium ureicelerivorans*, *Eubacterium limosum*, entre otros, como potenciales biomarcadores para la detección temprana de cepas de AR – VPH, su estratificación y el riesgo de las infecciones por VPH. Estos marcadores no solo se pueden relacionar con la presencia de infecciones por VPH sino también con la modulación de la respuesta inmune, ofreciendo perspectivas para la investigación y desarrollo de enfoques terapéuticos basados en la manipulación de la microbiota. El enfoque centrado en la búsqueda de marcadores biológicos representa un paso en la personalización de la prevención, diagnóstico y tratamiento de las infecciones por VPH.

Por último, futuras investigaciones deberán considerar las limitaciones de la metagenómica, así como los factores socio – demográficos con el fin de proporcionar una comprensión más completa de la microbiota cérvico – vaginal y su comportamiento en las infecciones ocasionadas por el VPH, su progresión, persistencia y desarrollo de cáncer cérvico – uterino.

**Contribución de los Autores:** Jorge Espinosa: Curación de datos (igual); Metodología (igual); Software (igual); Escritura, revisión y edición (líder). Andrés Herrera: Análisis formal (soporte); Investigación (soporte); Curación de datos (igual); Metodología (igual); Software (igual). Ricardo Tello: Conceptualización (líder); Curación de datos (igual); Análisis formal (líder); Investigación (líder); Metodología (igual); Administración de proyecto (líder); Software (igual); Visualización (líder); Escritura (líder).

**Financiamiento/Fondos:** “Esta investigación no recibió financiación alguna.

**Agradecimientos:** El autor desea agradecer al Msc. Manuel Herrera y a la doctora Delia Calderón profesores de la facultad de ciencias de la salud de la Universidad Particular Internacional SEK, por el apoyo técnico – científico a la presente investigación.

**Conflictos de Interés:** Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## Referencias citadas

- Ahire, J. J., Sahoo, S., Kashikar, M. S., Heerekar, A., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. S. (2023). In Vitro Assessment of *Lactobacillus crispatus* UBLCP01, *Lactobacillus gasseri* UBLG36, and *Lactobacillus johnsonii* UBLJ01 as a Potential Vaginal Probiotic Candidate. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(2), 275–286. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09838-9>
- Aksoy, P., Gottschalk, E. Y., & Meneses, P. I. (2017). HPV entry into cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 772, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.004>

- Ashique, S., Hussain, A., Fatima, N., & Altamimi, M. A. (2023). HPV pathogenesis, various types of vaccines, safety concern, prophylactic and therapeutic applications to control cervical cancer, and future perspective. *VirusDisease*, *34*(2), 172–190. <https://doi.org/10.1007/s13337-023-00824-z>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, *8*(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bermudez-Santana, C. I. (2016). Aplicaciones de la bioinformática en la medicina: El genoma humano. ¿Cómo podemos ver tanto detalle? *Acta Biologica Colombiana*, *21*(1), S249–S258. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n1sup.51233>
- Borgogna, J., Shardell, M., Santori, E., Nelson, T., Rath, J., Glover, E., Ravel, J., Gravitt, P., Yeoman, C., & Brotman, R. (2020). The vaginal metabolome and microbiota of cervical HPV-positive and HPV-negative women: a cross-sectional analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *127*(2), 182–192. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15981>
- Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2020). Pavian: interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics*, *36*(4), 1303–1304. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz715>
- Brotman, R. M., Shardell, M. D., Gajer, P., Tracy, J. K., Zenilman, J. M., Ravel, J., & Gravitt, P. E. (2014a). Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection. *Journal of Infectious Diseases*, *210*(11), 1723–1733. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu330>
- Brotman, R. M., Shardell, M. D., Gajer, P., Tracy, J. K., Zenilman, J. M., Ravel, J., & Gravitt, P. E. (2014b). Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection. *Journal of Infectious Diseases*, *210*(11), 1723–1733. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu330>
- Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Collado JJ, Gómez D, & Muñoz J. (2023). *Human Papillomavirus and Related Diseases Report ECUADOR*. [www.hpvcentre.net](http://www.hpvcentre.net)
- Chacón, J., Mateos, M. L., Sanz, I., Rubio, M. D., & Baquero, F. (2006). Genotipos de virus del papiloma humano más frecuentes en mujeres con citología cervicovaginal alterada utilizando técnicas de captura de híbridos y reacción en cadena de la polimerasa. *Clínica e Investigación En Ginecología y Obstetricia*, *33*(3), 97–101. [https://doi.org/10.1016/S0210-573X\(06\)74093-X](https://doi.org/10.1016/S0210-573X(06)74093-X)
- Chen, X., Lu, Y., Chen, T., & Li, R. (2021). The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.631972>
- Constantin, M., Chifiriuc, M. C., Mihaescu, G., Vrancianu, C. O., Dobre, E.-G., Cristian, R.-E., Bleotu, C., Bertesteanu, S. V., Grigore, R., Serban, B., & Cirstoiu, C. (2023). Implications of oral dysbiosis and HPV infection in head and neck cancer: from molecular and cellular mechanisms to early diagnosis and therapy. *Frontiers in Oncology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1273516>
- Cosper, P. F., Bradley, S., Luo, Q., & Kimple, R. J. (2021a). Biology of HPV Mediated Carcinogenesis and Tumor Progression. *Seminars in Radiation Oncology*, *31*(4), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2021.02.006>
- Cosper, P. F., Bradley, S., Luo, Q., & Kimple, R. J. (2021b). Biology of HPV Mediated Carcinogenesis and Tumor Progression. *Seminars in Radiation Oncology*, *31*(4), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2021.02.006>
- Cuccuru, G., Orsini, M., Pinna, A., Sbardellati, A., Soranzo, N., Travaglione, A., Uva, P., Zanetti, G., & Fotia, G. (2014). Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics*, *30*(13), 1928–1929. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu135>

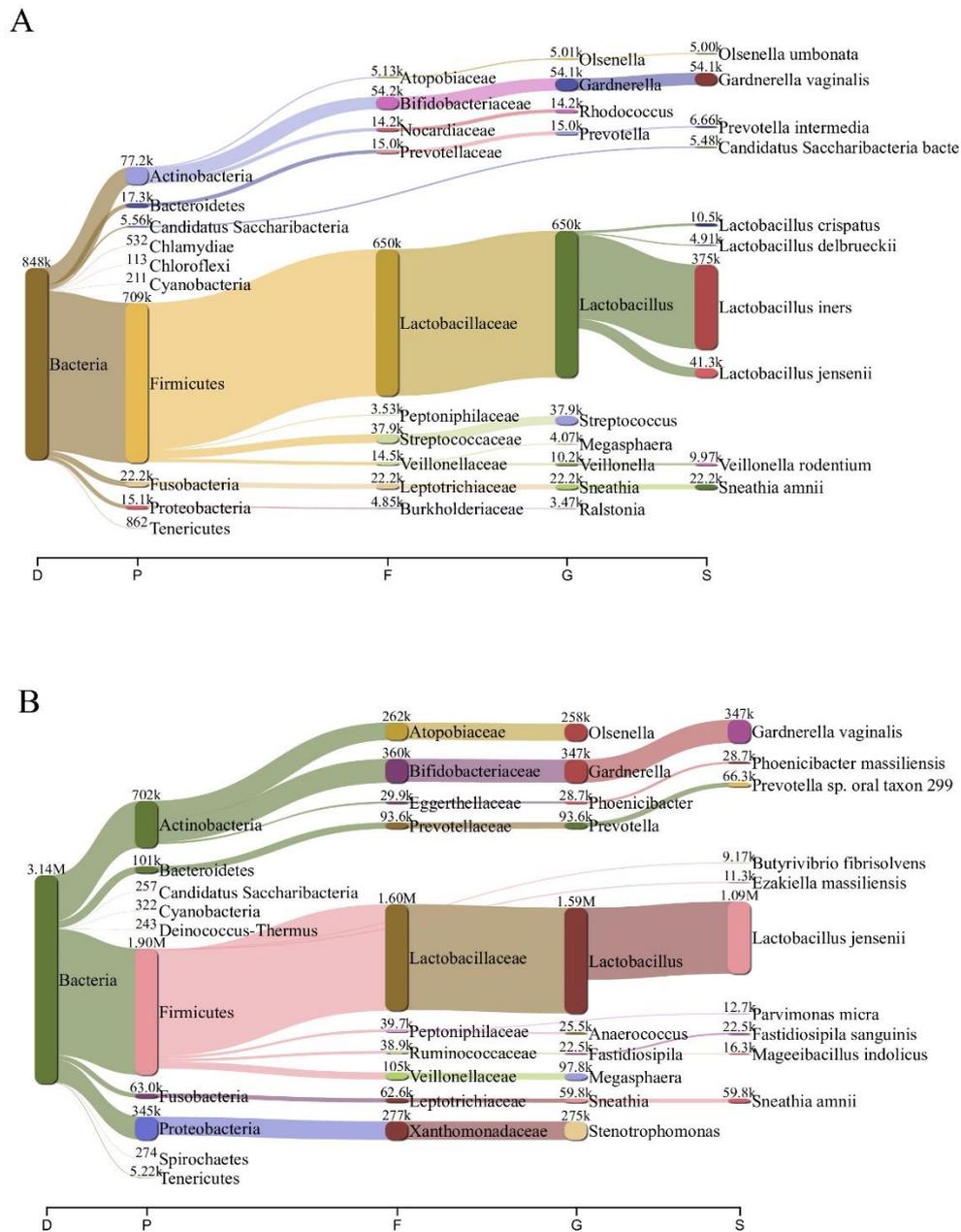
- Daniel Martínez-Peña, M., Castro-Escarpulli, G., & Aguilera-Arreola, M. G. (2013). Lactobacillus species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/189>
- Dareng, E. O., Ma, B., Famooto, A. O., AKAROLO-ANTHONY, S. N., OFFIONG, R. A., OLANIYAN, O., DAKUM, P. S., WHEELER, C. M., FADROSH, D., YANG, H., GAJER, P., BROTMAN, R. M., RAVEL, J., & ADEBAMOWO, C. A. (2016). Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women. *Epidemiology and Infection*, *144*(1), 123–137. <https://doi.org/10.1017/S0950268815000965>
- Di Paola, M., Sani, C., Clemente, A. M., Iossa, A., Perissi, E., Castronovo, G., Tanturli, M., Rivero, D., Cozzolino, F., Cavalieri, D., Carozzi, F., De Filippo, C., & Torcia, M. G. (2017). Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Scientific Reports*, *7*(1), 10200. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>
- DI PIERRO, F., CRISCUOLO, A. A., DEI GIUDICI, A., SENATORI, R., SESTI, F., CIOTTI, M., & PICCIONE, E. (2021). Oral administration of Lactobacillus crispatus M247 to papillomavirus-infected women: results of a preliminary, uncontrolled, open trial. *Minerva Obstetrics and Gynecology*, *73*(5). <https://doi.org/10.23736/S2724-606X.21.04752-7>
- Elizabeth, B., Altuzarra, D., del Carmen, M., Paula, A., & Eliseht, C. (2018). Evaluación mediante los estados vaginales básicos de la disfunción vaginal según diferentes factores de riesgo y caracterización de la microbiota lactobacilar.
- Elovitz, M. A., Gajer, P., Riis, V., Brown, A. G., Humphrys, M. S., Holm, J. B., & Ravel, J. (2019). Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. *Nature Communications*, *10*(1), 1305. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09285-9>
- Fang, B., Li, Q., Wan, Z., OuYang, Z., & Zhang, Q. (2022). Exploring the Association Between Cervical Microbiota and HR-HPV Infection Based on 16S rRNA Gene and Metagenomic Sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.922554>
- Hildesheim, A., Herrero, R., Castle, P. E., Wacholder, S., Bratti, M. C., Sherman, M. E., Lorincz, A. T., Burk, R. D., Morales, J., Rodriguez, A. C., Helgesen, K., Alfaro, M., Hutchinson, M., Balmaceda, I., Greenberg, M., & Schiffman, M. (2001). HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *British Journal of Cancer*, *84*(9), 1219–1226. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1779>
- Juárez, E., Rodríguez-Pulido, J., Enríquez, M., Franco, N., Cepeda, S., & Solis Soto, J. (2020). Prevotella intermedia, su mecanismo de acción, diagnóstico y tratamiento Una revisión de la literatura actual. *15*, 38–42.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, *9*(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, *10*(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- Leinonen, R., Sugawara, H., & Shumway, M. (2011). The Sequence Read Archive. *Nucleic Acids Research*, *39*(Database), D19–D21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1019>
- Liu, S., Li, Y., Song, Y., Wu, X., Baloch, Z., & Xia, X. (2022). The diversity of vaginal microbiome in women infected with single HPV and multiple genotype HPV infections in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.642074>
- López-Fillo, M., Cortez, F. J., Gheit, T., Cruz y Cruz, O., Cruz-Talonia, F., Chávez-Torres, M., Arteaga-Gómez, C., Mancilla-Herrera, I., Montesinos, J. J., Cortés-Morales, V. A., Aguilar, C., Tommasino, M., Pinto-Cardoso, S., & Rocha-Zavaleta, L. (2022). Altered Vaginal Microbiota Composition Correlates With Human Papillomavirus and Mucosal Immune Responses in Women With Symptomatic Cervical Ectopy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.884272>

- Lu, J., Rincon, N., Wood, D. E., Breitwieser, F. P., Pockrandt, C., Langmead, B., Salzberg, S. L., & Steinegger, M. (2022). Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nature Protocols*, *17*(12), 2815–2839. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00738-y>
- Madi, N., Vos, M., Murall, C. L., Legendre, P., & Shapiro, B. J. (2020). Does diversity beget diversity in microbiomes? *ELife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.58999>
- Martín, R., Soberón, N., Vázquez, F., & Suárez, J. E. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *26*(3), 160–167. <https://doi.org/10.1157/13116753>
- Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Müller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S. A., Sonnemann, I., Wäschke, N., Wubet, T., Wurst, S., & Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and Evolution*, *4*(18), 3514–3524. <https://doi.org/10.1002/ece3.1155>
- Mpho, R. (2022). CHARACTERIZATION OF CERVICOVAGINAL HPV VIROME AND BACTERIOME IN HIV-INFECTED WOMEN IN NORTHERN SOUTH AFRICA.
- Murdoch, D. A. (1998). Gram-Positive Anaerobic Cocci. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(1), 81–120. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.81>
- Oh, H. Y., Kim, B.-S., Seo, S.-S., Kong, J.-S., Lee, J.-K., Park, S.-Y., Hong, K.-M., Kim, H.-K., & Kim, M. K. (2015). The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clinical Microbiology and Infection*, *21*(7), 674.e1-674.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.026>
- Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 385. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
- Ortiz-Burgos, S. (2016). *Shannon-Weaver Diversity Index* (pp. 572–573). [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8801-4\\_233](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8801-4_233)
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, *35*(9), 833–844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., & Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(supplement\_1), 4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
- Restrepo Arenas, V., Velásquez Rivera, V., Puerta Suárez, J., & Cardona Maya, W. D. (2021). Flujo vaginal y semen: La microbiota de las relaciones sexuales. *Revista Urología Colombiana / Colombian Urology Journal*, *30*(02), 140–144. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1721325>
- Roy, R., & Singh, S. K. (2024). The Microbiome Modulates the Immune System to Influence Cancer Therapy. *Cancers*, *16*(4), 779. <https://doi.org/10.3390/cancers16040779>
- Singer, M., Koedooder, R., Bos, M. P., Poort, L., Schoenmakers, S., Savelkoul, P. H. M., Laven, J. S. E., de Jonge, J. D., Morré, S. A., & Budding, A. E. (2021). The profiling of microbiota in vaginal swab samples using 16S rRNA gene sequencing and IS-pro analysis. *BMC Microbiology*, *21*(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02149-7>
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, *15*(3), R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
- Zeng, M., Li, X., Jiao, X., Cai, X., Yao, F., Xu, S., Huang, X., Zhang, Q., & Chen, J. (2023). Roles of vaginal flora in human papillomavirus infection, virus persistence and clearance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1036869>

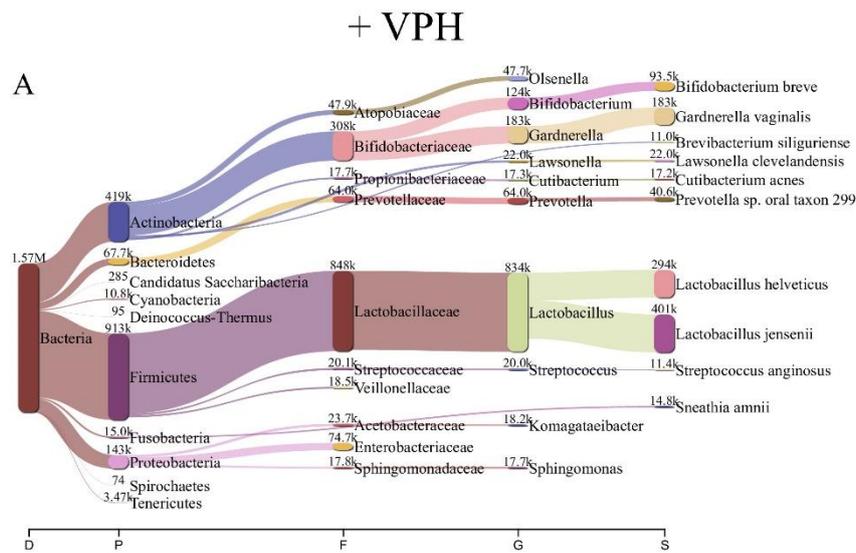
## **Anexos**



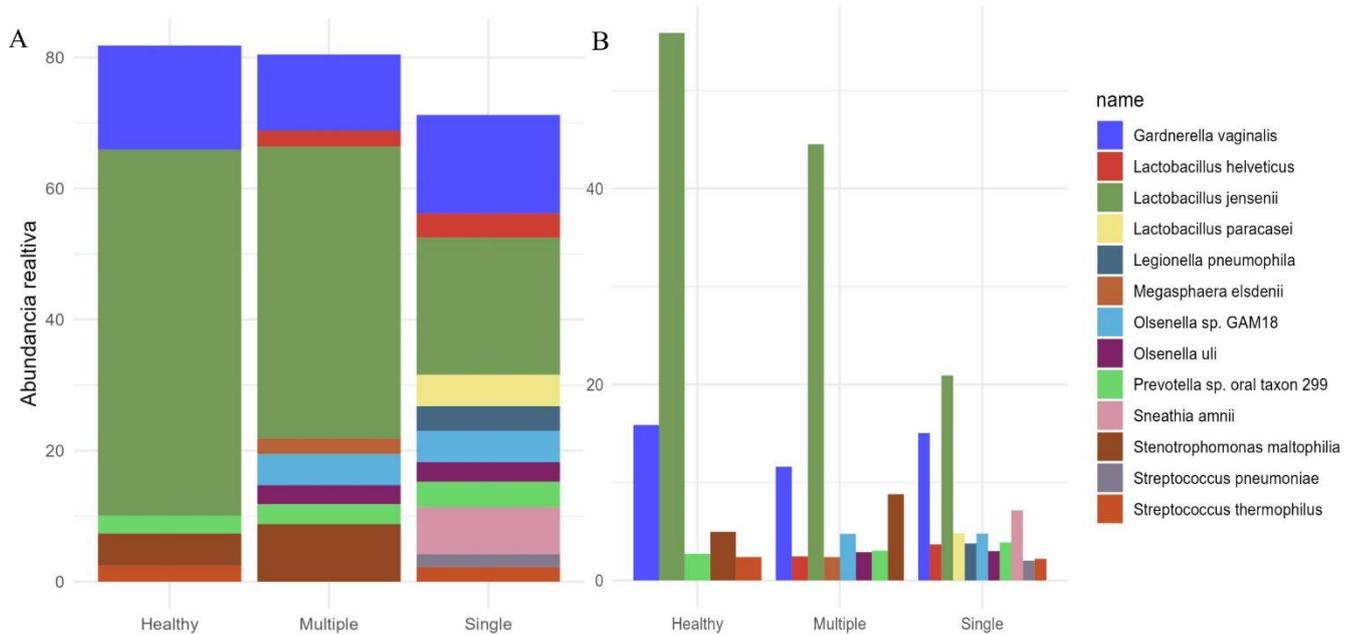
## M - VPH



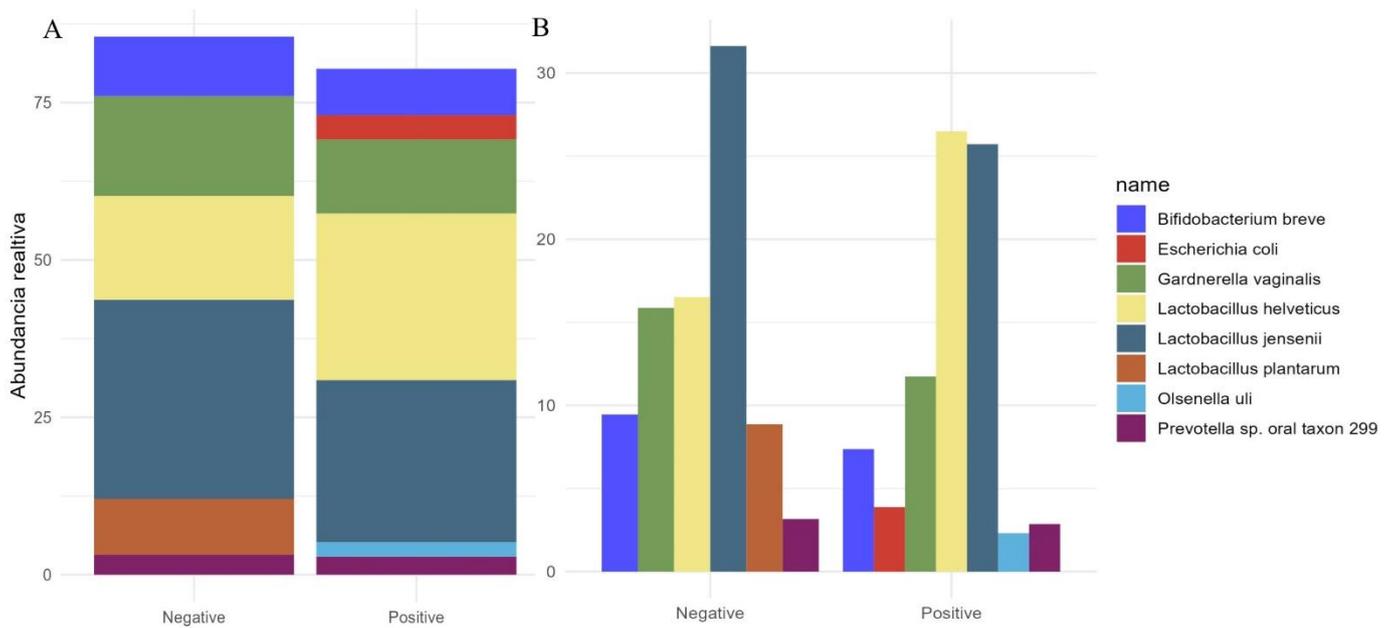
**Figura S2.** Representación Sankey de caracterización microbiana: Porcentaje de lecturas metagenómico a nivel de familia, género y especie observado en dependencia del tipo de infección y el origen geográfico de las secuencias A) China B) México C) Italia



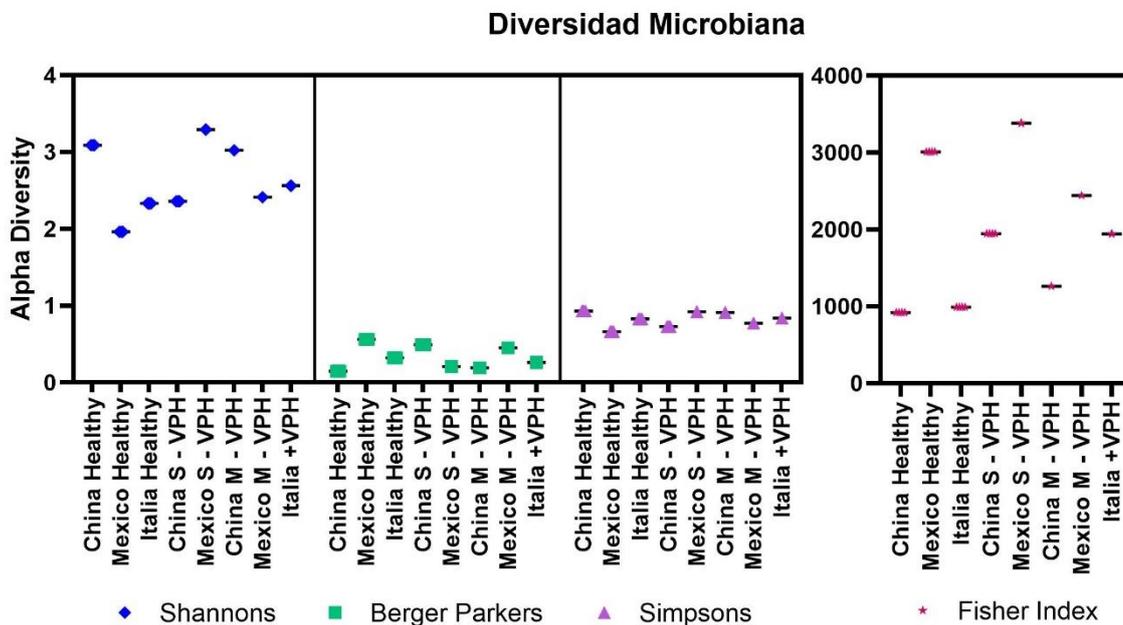
**Figura S3.** Representación Sankey de caracterización microbiana: Porcentaje de lecturas metagenómico a nivel de familia, género y especie observado en dependencia del tipo de infección y el origen geográfico de las secuencias A) Italia



**Figura S4.** Análisis de abundancia relativa y composición de la microbiota cérvico – vaginal en dependencia del tipo de infección por VPH a nivel de especie; base de datos: México. A) Representación de barra compacta de las comunidades bacterianas identificadas: M – VPH, S – VPH y -VPH (Healthy), B) Diagrama de barras de las comunidades bacterianas identificadas: M – VPH, S – VPH y -VPH (Healthy).



**Figura S5.** Análisis de abundancia relativa y composición de la microbiota cérvico – vaginal en dependencia del tipo de infección por VPH a nivel de especie; base de datos: Italia. A) Representación de barra compacta de las comunidades bacterianas identificadas: M – VPH, S – VPH y -VPH (Healthy), B) Diagrama de barras de las comunidades bacterianas identificadas: M – VPH, S – VPH y -VPH (Healthy).



**Figura S6.** Diversidad microbiana bajo el índice Shannon, Berger Parker's, Simpson e Índice de Fisher de diversidad alfa de las diferentes regiones (China, México e Italia) y el tipo de infección por VPH.