

HPV MICROBIOTA E CANCRO CERVICALE:

nuove evidenze scientifiche



DOTT. ANTONIO PELLEGRINO
Direttore UOC Ostetricia
Ginecologia
Direttore Dipartimento
Innovazioni Tecnologiche e
Chirurgia Robotica
Ospedale A. Manzoni Asst
Lecco



DOTT. MATTEO MAURI
Dirigente Medico Ostetricia
Ginecologia Ospedale A.
Manzoni Asst Lecco

IL RAPPORTO TRA CANCRO DELLA CERVICE UTERINA (CC), l'infezione persistente da Human Papillomavirus (HPV) e la composizione del microbiota cervicale / vaginale è un argomento sempre più studiato.

Mentre è ben noto che l'HPV ad alto rischio (es. tipi 16 e 18) costituisce il fattore centrale nel percorso di carcinogenesi cervicale, non tutte le infezioni HPV evolvono verso lesioni intraepiteliali o tumore: ciò suggerisce che altri cofattori (ambientali, immunitari, microbiologici) contribuiscano.

Negli ultimi anni numerosi studi hanno esplorato come la comunità microbica del tratto genitale inferiore (e in alcuni casi anche dell'intestino) per capire se e come la composizione del microbiota vaginale possa influenzare: l'acquisizione dell'HPV, la sua persistenza o clearance, la progressione verso lesioni precancerose (CIN/HSIL) o il cancro vero e proprio.

Si stima che circa il 20% dei tumori umani sia correlato ad un'infezione.

L'HPV è uno dei virus più noti in questo contesto, soprattutto per il suo legame con i tumori cervicali e altre neoplasie. L'HPV è una delle infezioni sessualmente trasmesse più diffuse al mondo, e la maggior parte delle persone sessualmente attive entra in contatto con il virus almeno una volta nella vita. Ha una elevata probabilità di trasmissione (40-60%) dopo un rapporto non protetto o semplici contatti cute-cute o cute mucose. L'incubazione del virus varia da 3 settimane ad alcuni mesi ed è frequente l'infezione multipla di più ceppi del virus. L'incidenza e la prevalenza dell'infezione decrescono con l'età, ma la persistenza dell'infezione sembra aumentare con l'età.

Esistono 5 differenti generi di HPV: A tropismo specifico per l'epitelio mucoso: - α -papillomavirus A tropismo specifico per l'epitelio cutaneo: - β -papillomavirus - γ -papillomavirus - μ -papillomavirus - ν -papillomavirus.

L'infezione è generalmente transiente: fino al 90% dei casi si risolve entro 12-24 mesi. Ma in

circa il 10% dei casi si ha persistenza dell'infezione da HPV. La persistenza dell'infezione è associata ad aumento del rischio di lesioni di alto grado. La percentuale di infezioni persistenti aumenta con l'età della paziente.

L'International Agency for Research on Cancer ha classificato i genotipi HPV sulla base del loro potenziale oncogenico.

GRUPPO 1

(Agente carcinogeno per l'uomo)

HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59

GRUPPO 2A

(Agente probabile carcinogeno)

HPV 68

GRUPPO 2B

(Agente possibile carcinogeno)

HPV 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82

GRUPPO 3

(Agenti non carcinogeni)

HPV 6, 11

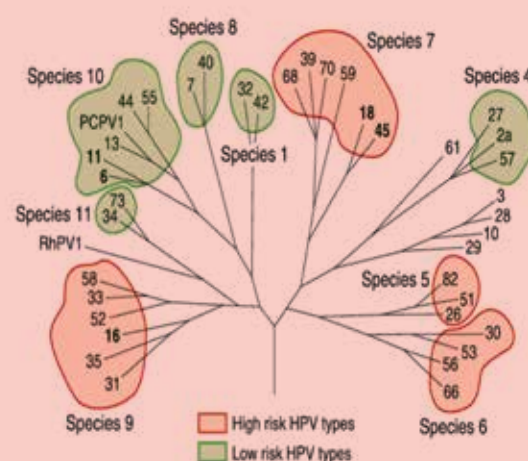
La **storia naturale** delle infezioni è caratterizzata dall'equilibrio che si instaura fra soggetto ospitante e agente infettante. In questo equilibrio dinamico svolgono un ruolo:

- **La risposta cellulare innata:** Antigen Presenting Cells, CD4+, CD8+ e Cellule Natural Killer.
- **La risposta cellulare umorale:** Produzione di IgG e IgA con risoluzione dell'infezione.

Sfortunatamente... l'HPV ha capacità evasive della risposta immunitaria innata e produce un ritardo nell'attivazione della risposta immunitaria adattativa

✓ **L'infezione è caratterizzata da assenza di viremia:** gli HPV sono virus epitelio-tropici che infettano le cellule basali degli epiteli. Raro accesso al sistema vascolare e/o ai linfonodi regionali.

Genus Alpha-papillomaviruses



Squamous epithelium:

Superficial zone

Mid zone

Basal layer

Basement membrane

Dermis

(a)

CD4+ and CD8+ antigen-specific cells

Langerhans cell

Cytokines

Alpha-GalCer plus antigen

NKT cell

IFN

✓ **L'espressione genica è limitata e strettamente intracellulare:** le proteine precoci che mediano la proliferazione cellulare negli strati basali dell'epitelio (E1, E2, E6, E7) sono espresse a livelli inferiori rispetto alla soglia di rilevamento da parte del sistema immunitario. Le proteine virali altamente immunogene, come L1, sono sintetizzate solo nei cheratinociti differenziati che vengono rilasciati per desquamazione

✓ **Non è accompagnata da infiammazione:** non c'è rilascio di citochine pro-infiammatorie per l'attivazione delle APC (Antigen Presenting Cells). E6 e E7 effettuano una down-regolazione dell'espressione dei geni IFN- α , abolendo la via di attivazione IFN - dipendente.

✓ **Il virus può rimanere** in forma episomica o integrata.

Molti sono i cofattori chiamati in causa nel processo infettivo

Cofattori

- Età precoce del primo rapporto sessuale
- Numero elevato di partner sessuali
- Basso livello di istruzione
- Fumo di sigaretta
- Gravidanze multiple
- Utilizzo a lungo termine di estroprogestinici
- Radiazioni ionizzanti ad alte dosi
- Co-infezione con altri virus a trasmissione sessuale (es. CMV, HHV-6, HHV-7 e HSV-2)
- Stati di immunodeficienza (HIV, chemioterapia, trapianti, stato nutrizionale)
- Alterazioni Genetiche/Epigenetiche (pRB, p53, p63, p21, p27, cicline/CDK2, telomerasi, instabilità dei microsatelliti, COX-2)

Alterazione microbiota vaginale: nuovo cofattore?

The Human Microbiome Project

Progetto iniziato nel 2007 della durata 5 anni con l'impiego di 115 milioni di dollari, con lo scopo di:

- conoscere e studiare la composizione del microbiota umano dei vari distretti corporei.
- identificare le condizioni di alterazione del microbiota (disbiosi) e le loro cause.
- trovare nuove strategie preventive e terapeutiche.

Lo studio (Vaginal microbiome of reproductive

age women di Jacques Ravel) edito nel 2010 che fa seguito l'interesse mostrato per il microbioma, si occupa di approfondire le conoscenze dei meccanismi attraverso i quali il microbioma vaginale contribuisce a prevenire le malattie urogenitali nelle donne e a mantenere la salute. Lo studio di Ravel (Pnas, 2011) ha permesso di descrivere per la prima volta in modo sistematico la struttura e la variabilità del microbioma vaginale nelle donne in età riproduttiva. Analizzando con tecniche di pirosequenziamento del gene 16S rRNA i campioni di 396 donne asintomatiche appartenenti a quattro gruppi etnici (bianche, nere, ispaniche e asiatiche), sono stati identificati cinque differenti "Community State Types" (CST), ossia tipologie di comunità microbiche caratterizzate da composizioni batteriche distinte

Quattro di questi tipi (CST I, II, III e V) risultano dominati da specie di *Lactobacillus*, batteri che svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'equilibrio vaginale e nella prevenzione delle infezioni.

➔ **CST I** è dominato da *Lactobacillus crispatus*, associato a un ambiente fortemente acido (pH ≤ 4.5) e considerato lo stato più stabile e protettivo, poiché l'acido lattico prodotto da questa specie esercita un marcato effetto antimicrobico e mantiene l'ecosistema in equilibrio.

➔ **CST II**, dominato da *Lactobacillus gasseri*, presenta caratteristiche simili ma con una stabilità leggermente inferiore.

➔ **CST III**, in cui prevale *Lactobacillus iners*, rappresenta invece una condizione più variabile: pur essendo spesso riscontrato in donne sane, tende a coesistere con specie potenzialmente patogene e viene talvolta interpretato come uno stato "di transizione" verso condizioni di disbiosi.

➔ **CST V**, dominato da *Lactobacillus jensenii*, è meno frequente ma anch'esso associato a un microambiente vaginale acido e protettivo

➔ **Il CST IV** costituisce un gruppo distinto, caratterizzato dall'assenza di un *Lactobacillus* dominante e dalla presenza di una flora microbica eterogenea, composta prevalentemente da anaerobi come *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella*, *Mobiluncus* e altre specie. Questo stato è associato a un pH vaginale più elevato, a una maggiore instabilità dell'ecosistema e a una maggiore suscettibilità a infezioni urogenitali, in particolare alla vaginosi batterica.

Ravel e colleghi hanno inoltre osservato che la distribuzione dei CST varia in modo significativo tra i diversi gruppi etnici, suggerendo che fattori genetici, ambientali e comportamentali possano modulare la composizione del microbioma vaginale.

Questo approccio ha permesso di sintetizzare una complessità altissima (centinaia di specie) in pochi "stati ecologici" interpretabili clinicamente, utili per epidemiologia, correlazioni con patologie, studio della variabilità intra- e inter-individuo.

Tuttavia, il clustering gerarchico ha presentato dei limiti per eccesso di variabilità in relazione a campione analizzato, regione geografica e metodo di analisi, rendendo difficili comparazioni tra studi diversi.

Per poter fornire una classificazione più adatta-

bile e rappresentativa, dalla prima Community State Type del 2011 venne sviluppata e pubblicata una nuova classificazione nel 2020, chiamata: Valencia (VAGinal community state type Nearest Centroid classifier).

Un algoritmo basato sul metodo "nearest-centroid classification". L'idea: costruire centroidi di riferimento (ossia composizioni "medie rappresentative") per ogni CST, usando un dataset molto ampio (nel paper originario: oltre 13mila profili microbici vaginali da quasi 2.000 donne statunitensi). Una volta definiti i centroidi, qualsiasi nuovo profilo microbiotico può essere "assegnato" al CST più simile in modo standardizzato, mediante una misura di similarità.

Con Valencia vengono archiviati i 5 "classici" CST e vengono definite tredici sub-CST basate su combinazioni più precise e variegate di composizioni batteriche. Inoltre, Valencia si è dimostrata applicabile con buona precisione a contesti internazionali.

Fattori di variabilità:

➔ **Etnia:** è associata in modo significativo con modificazioni della composizione vaginale per lo più dovute a motivi genetici, sociali e culturali. Le donne caucasiche e asiatiche hanno una maggior prevalenza di microbiota *Lactobacillus*-dominant rispetto alle Ispaniche e alle donne di colore.

➔ **Farmacologici\iatrogeni:** i contraccettivi ormonali modulano il pH e la flora (effetto variabile a seconda del tipo: COC, POP, IUD). Gli antibiotici riducono selettivamente i lattobacilli. Altri farmaci corticosteroidi o immunosoppressori ne alterano la composizione.

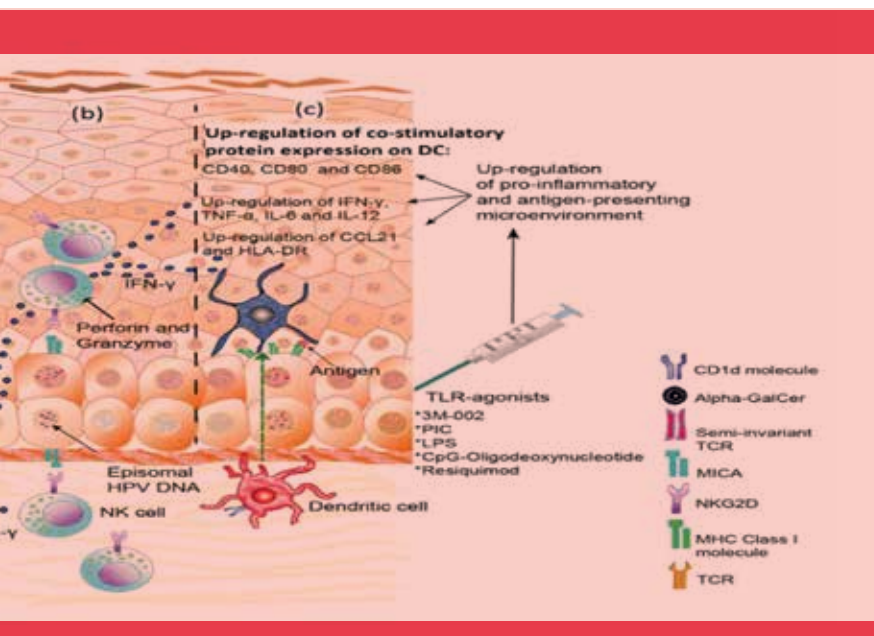
➔ **Ormonali\fisiologici:** ciclo mestruale (fluttuazioni ormonali), gravidanza- menopausa- pubertà / età premenarcale. Gli estrogeni favoriscono la crescita di lattobacilli (aumento del glicogeno epiteliale e acidificazione del pH) e hanno una grande influenza sul microbiota vaginale, fornendo la massima stabilità durante il ciclo mestruale al momento del picco degli estrogeni. La caduta estrogenica (menopausa, post-parto) riduce lattobacilli e aumenta pH ➔ disbiosi. La composizione del microbiota vaginale si modifica con l'età.

➔ **Infettivi:** infezioni batteriche (es. *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*), infezioni virali (es. HPV, HSV-2), infezioni fungine (*Candida* spp.), parassitosi (*Trichomonas vaginalis*), inducono infiammazione e modificano l'ambiente vaginale, facilitando la disbiosi o la predominanza di specie anaerobiche.

➔ **Ambientali\sistemiche:** stress psico-fisico cronico, alimentazione squilibrata (povera di fibre, ricca di zuccheri), diabete / dismetabolismi, fumo di sigaretta, alterazioni immunitarie e metaboliche multifattoriali che producono minore difesa mucosale e una modifica indiretta del pH e del metabolismo locale.

Può esserci un ruolo di casualità tra microbiota vaginale e cancerogenesi HPV correlata?

La barriera mucosa possiede caratteristiche specializzate di protezione da patogeni esterni. I microrganismi, l'immunità locale e i geni dell'ospite interagiscono per regolare l'omeostasi dell'ambiente vaginale.



Il microbiota modula la struttura e la funzione dello strato mucoso cellulare, preservando le tight junction e rendendo l'epitelio mucosale una barriera di difesa essenziale tra le cellule epiteliali dell'ospite e i patogeni invasivi delle infezioni virali. Lo strato di muco funge da filtro, bloccando l'accesso microbico allo strato epiteliale e, al tempo stesso, fornendo nutrienti al microbiota che risiede al suo interno e nei suoi dintorni. (Mar 2025 Mirto Papamentzelopoulou: Unlocking the Interactions Between the Whole-Body Microbiome and HPV Infection: A Literature review.)

Numerose evidenze supportano il ruolo regolatorio del microbiota vaginale nelle risposte immunitarie locali dell'ospite. Gli stati patologici sono stati associati a un'umentata diversità del microbioma vaginale non dominato da *Lactobacillus*, mentre la salute vaginale è stata correlata a una minore diversità, tipica dei microbiomi dominati da *Lactobacillus*. Le lesioni intraepiteliali squamose (SIL) e l'infezione da HPV cervicale sono state entrambe associate alla disbiosi vaginale.

Studio prospettico caso-controllo su 169 pazienti tra i 18 e i 45 anni. Si evidenzia come la disbiosi abbia una relazione con la progressione delle lesioni HPV-relate.

- **CST IV** è associato con un trend incrementale alla progressione della displasia (presente nel 10% dei profili normali; nel 21% delle LSIL; nel 27% delle HSIL e nel 40% degli ICC)

Ha il tasso più basso di regressione dell'infezione da HPV

- **CST I** è associato con trend decrementale alla progressione della displasia (presente nel 50% dei profili normali; nel 42% delle LSIL; nel 40% delle HSIL; e nel 20% degli ICC)

- **Alti livelli di *Sneathia sanguinegens*** ($p < 0.01$), *Anaerococcus tetradius* ($p < 0.05$), e *Peptostreptococcus anaerobius* ($p < 0.05$) sono più facilmente associati a HSIL rispetto ad LSIL.

Rispetto ai controlli:

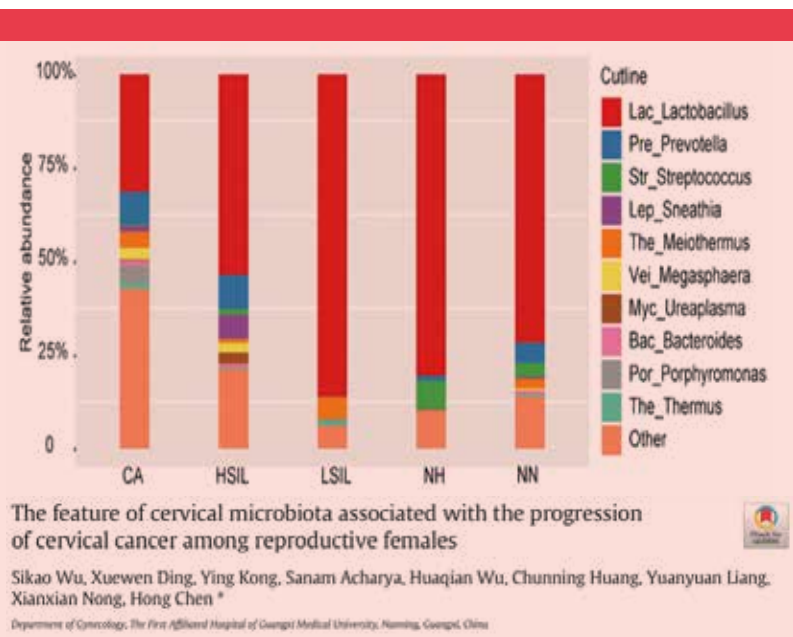
- **aumento di 2 volte** nella prevalenza del microbioma vaginale di tipo CST IV nelle donne con LSIL

- **aumento di 3 volte** nelle donne con HSIL (lesioni di alto grado)
- **aumento di 4 volte** nelle donne con carcinoma invasivo

Le alterazioni del microbiota vaginale, con instabilità *Lactobacillus* spp, possono contribuire a creare condizioni favorevoli alla persistenza dell'infezione da HPV, con la possibilità di portare nel tempo alla progressione verso la Neoplasia Intraepiteliale Cervicale (CIN) e allo sviluppo del carcinoma della cervice uterina.

Anche la vaginosi batterica influisce sull'instaurarsi e sulla persistenza dell'infezione da HPV: è stato infatti osservato che la vaginosi batterica associata al CST IV si correla con la persistenza dell'HPV, e che i biomarcatori implicati in tale condizione sono le specie *Atopobium* e il gene della sialidasi di *Gardnerella vaginalis*.

Studio di coorte – Analisi dei campioni vaginali, mediante sequenziamento del DNA di 87 donne tra i 16 e i 26 anni con diagnosi istologica di CIN



Analisi del 16S rDNA del microbiome del muco cervicale di 94 partecipanti lo studio (età compresa tra 18 e 52 anni), includenti 13 tumori della cervice (CA), 31 displasie di alto grado (HSIL), 10 displasie di basso grado (LSIL), 12 pazienti con infezione da HPV (NH) e 28 controlli sani (NN). Da notare come nei gruppi HSIL e CA diminuisca la rappresentazione delle specie Lactobacillari a vantaggio di un incremento della disbiosi e della presenza di Prevotella, Gardnerella e altri...

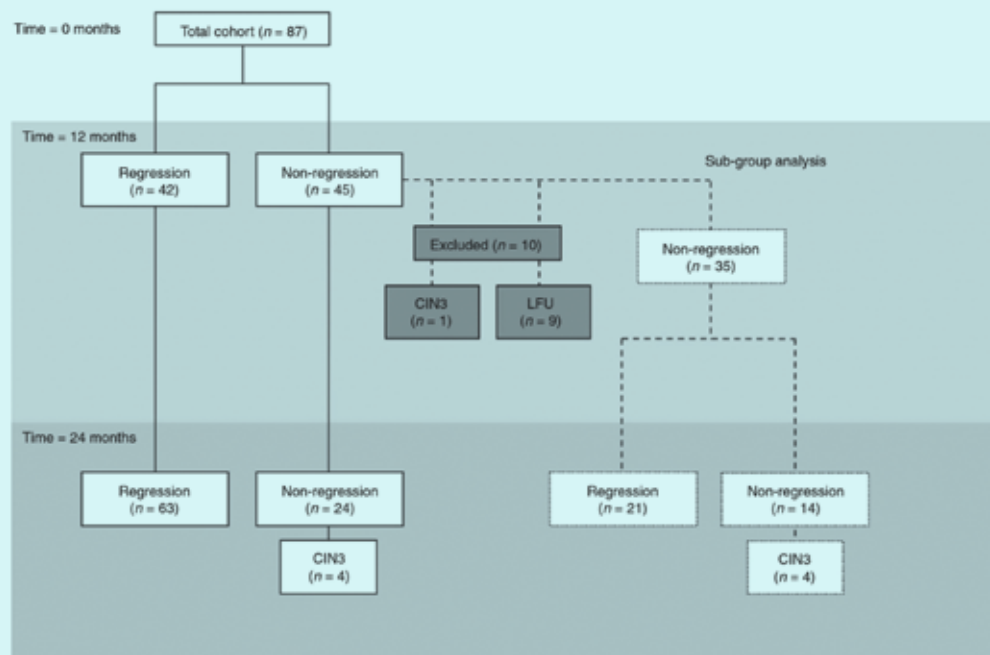
La composizione del microbiota vaginale e del muco cervicale delle pazienti incluse nello studio varia con la progressione e la severità delle alterazioni cellulari.

Le infezioni da HPV ad alto rischio o la presenza di displasia/cancro risultano più comuni nei microbiomi vaginali dominati da *Lactobacillus* iners o da specie non-*Lactobacillus* rispetto a quelli dominati da *Lactobacillus crispatus*, essendo associati ad ecosistemi vaginali più instabili e ad una maggiore tendenza a passare ad un microbiota vaginale alterato (CST IV).



The vaginal microbiota associates with the regression of untreated cervical intraepithelial neoplasia 2 lesions

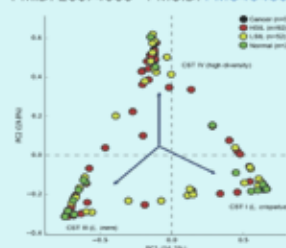
Anita Mitra^{1,2}, David A. MacIntyre^{1,3}, George Ntirtsos⁴, Ann Smith⁵, Konstantinos K. Tsilidis^{4,6}, Julian R. Marchesi^{3,7,8}, Phillip R. Bennett^{1,2,3}, Anna-Barbara Moscicki^{9,10} & Maria Kyrgiou^{1,2,10}



Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity

A Mitra^{1,2}, D A MacIntyre¹, Y S Lee¹, A Smith³, J R Marchesi^{3,4}, B Lehne⁵, R Bhatia⁶, D Lyons⁷, E Paraskevidis⁸, J V Li⁴, E Holmes⁴, J K Nicholson⁴, P R Bennett^{1,2}, M Kyrgiou^{1,2}

Affiliations + expand
PMID: 26574055 PMCID: PMC4648063 DOI: 10.1038/srep16865



2. Follow up a 12 e 24 mesi con contestuale analisi della composizione del microbiota vaginale. Obiettivo: determinare se il microbiota vaginale influenza il tasso di regressione delle lesioni HPV-relate a 24 mesi

Regressione Lesioni Cin2

Le donne che al tempo 0 presentavano un microbiota dominato da Lattobacilli avevano un più alto tasso di clearance virale spontanea. Un microbiota carente di Lattobacilli e con presenza di anaerobi come Megasphaera, Prevotella e Gardnerella vaginalis erano associati ad una minor clearance virale o, addirittura, ad una persistenza del CIN2

I dati suggeriscono quindi un'associazione tra alcuni tipi di comunità batteriche del micro-



biota vaginale e alterazione dei pathway di signaling dell'immunità cellulare che possono favorire l'infezione da HPV. Questo può essere utile per identificare dei biomarker e guidare le opzioni terapeutiche.

Probiotici come strategia terapeutica

L'uso dei probiotici come potenziale linea di trattamento per la displasia cervicale ha fornito preziose informazioni sulle dinamiche di interazione ospite-patogeno all'interno del tratto genitale femminile.

I probiotici possono intervenire in maniera favorevole attraverso una serie di meccanismi:

- Acidificazione della mucosa modificando il pH vaginale
- Inibizione dei patogeni attraverso: produzione di prodotti antibatterici, competizione per i recettori di membrana e prevenzione dell'adesività dei patogeni alla mucosa.
- Produzione di immunomodulatori

Obiettivi:

- Determinare come i probiotici modificano la costituzione del microbiota vaginale e quanto questi cambiamenti sono rilevanti ai fini della clearance dell'infezione da HPV
- Creare probiotici specifici sulla base delle note interazioni tra microbiota vaginale e HPV
- Creare probiotici a partire dal microbiota vaginale di soggetti sani non HPV +

Uno studio prospettico, multicentrico, randomizzato e controllato vs placebo, condotto su 62 donne di nuova diagnosi di infezione da HPV senza lesioni cervicali visibili alla colposcopia. Obiettivo principale: la valutazione del ruolo esercitato dal trattamento orale (quotidiano, per 4 mesi) con il ceppo *Lactobacillus crispatus* M247 nel favorire la clearance dell'HPV ad alto rischio (HR-HPV) e il cambiamento del tipo di comunità microbica vaginale (CST). I risultati dello studio hanno dimostrato che il trattamento probiotico, rispetto al controllo, ha determinato un incremento significativo di: clearance dell'HPV (60% contro 31,8%), PAP test negativi (83,3% contro 71,4%), favorendo inoltre il ripristino dell'eubiosi del microbiota vaginale.

Le donne che ospitano $\geq 10^6$ CFU/mL di CTV-05 sembrano protette da episodi ricorrenti di vaginosi batterica. Inoltre, la colonizzazione da parte di *L. crispatus* era considerevolmente maggiore nel braccio della LACTIN-V rispetto al braccio placebo sia a 12 settimane (82% vs 35%, rispettivamente) che a 24 settimane (64% vs 22%, rispettivamente). Così, senza il trattamento con LACTIN-V solo circa 1/3 delle donne nella popolazione dello studio si ricolonizzerebbe spontaneamente con *L. crispatus* endogeno dopo il trattamento con metronidazolo. Conclusioni: reintegrare il microbiota vaginale disbiotico con il protettivo *L. crispatus* CTV-05 è un approccio promettente per prevenire le infezioni ricorrenti e migliorare la salute delle donne.

Anche se i Lattobacilli sono dominanti in più del 70% dei microbioti vaginali di donne sane, l'assenza di un microbiota vaginale dominato da Lattobacilli non implica direttamente una condizione di disbiosi. Vi è pertanto un'inter-

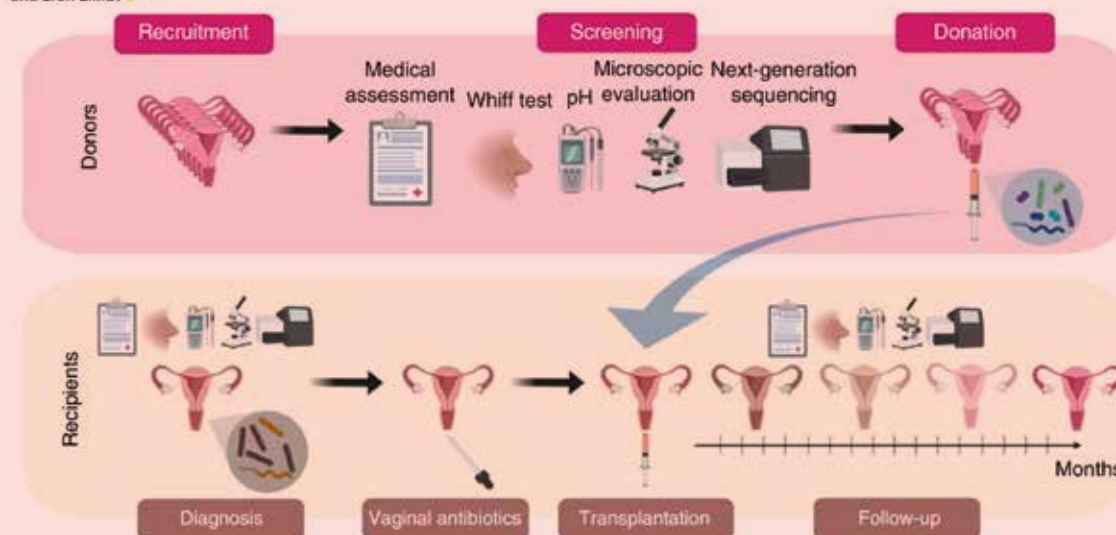
azione tra più fattori. Importante formulare dei probiotici con target precisi.

Case series di 5 pazienti con vaginosi non responsiva a nessun trattamento, che hanno ricevuto un trapianto di microbiota vaginale (VMT) dalla stessa donatrice sana.

Questo studio dimostra la fattibilità dell'esecuzione del VMT e del suo potenziale successo dove altri trattamenti hanno fallito. Non si possono, tuttavia, escludere potenziali rischi o complicanze associate (es. trapianto di microrganismi resistenti o patogeni presenti nel fluido vaginale, complicanze iatrogene, gravidanza dovuta a trasferimento di sperma). Il VMT dovrebbe essere considerato solo in caso di ripetuti fallimenti con le terapie tradizionali in pazienti con vaginosi batterica cronica e una compromissione sostanziale della qualità della vita. Sono necessari trial clinici randomizzati e caso-controllo per definire meglio l'efficacia del VMT come tipo di trattamento e il suo ambito di applicazione.

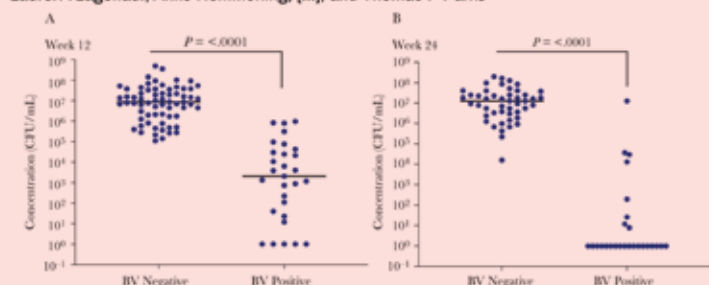
Vaginal microbiome transplantation in women with intractable bacterial vaginosis

Ahinoam Lev-Sagie^{1,4*}, Debra Goldman-Wohl^{1,4}, Yotam Cohen^{2,4}, Mally Dori-Bachash³, Avner Leshem^{2,3}, Uri Mor², Jacob Strahilevitz⁴, Allon E. Moses⁴, Hagit Shapiro², Simcha Yagel¹ and Eran Elinav^{2,3,4*}



Connecting the Dots: Translating the Vaginal Microbiome Into a Drug

Laurel A Lagenaar, Anke Hemmerling, [...], and Thomas P Parks



COSA NON È ANCORA CHIARISSIMO

- Non vi è ancora una prova incontrovertibile di causalità: sebbene vi siano associazioni consistenti tra disbiosi e progressione HPV → CIN → cancro, non è ancora stabilito se la disbiosi causa la persistenza/invasione oppure è conseguenza del danno epiteliale/virale.
- La eterogeneità degli studi è elevata: diverse popolazioni, metodi di campionamento (vagina vs cervice vs suzione), regioni geografiche, tecniche di sequenziamento (16S vs shotgun), rendono difficile confrontare i risultati.
- Mancano studi longitudinali robusti che seguano le donne nel tempo per verificare come

cambia il microbiota dal momento dell'infezione HPV all'eventuale progressione verso lesioni o guarigione.

- Le interazioni tra microbiota, HPV, immunità, ormoni e altri fattori ambientali sono complesse e poco decifrate.
- Non è ancora definita la specificità dei microrganismi "marker": quali genera o specie sono effettivamente predittivi, in quali popolazioni, e con quale sensibilità/specificità.
- Le modalità di intervento (tipo di probiotico, durata, target) non sono ancora standardizzate né validate in grandi trial clinici.