



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

**ESTUDIO DE LAS VARIACIONES DE LA
MICROBIOTA PRESENTE EN CÉRVIX DE
MUJERES ATENDIDAS EN EL INCAN
DURANTE EL TRATAMIENTO POR CÁNCER
CERVICOUTERINO**

TESIS

Para Obtener el Grado de:
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta: M. en C.O. Gaudy Lizeth Manzanares Leal

Comité Tutorial:

Dra. Ninfa Ramírez Durán
Tutor Académico

Dra. Lilia Patricia Bustamante Montes
Tutor Interno

Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo
Tutor Externo

Toluca, Estado de México, 12 de noviembre de 2018



VOTOS APROBATORIOS



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

Fecha: 22 de octubre de 2018

DICTAMEN DE VOTOS APROBATORIOS TESIS

Los docentes que integran el **COMITÉ DE TUTORES** de la maestra: Gaudy Lizeth Manzanares Leal, egresada del programa del Doctorado en Ciencias de la Salud de la generación 2015-2018, quien realizó el trabajo de tesis titulado: "Estudio de las variaciones de la microbiota presente en cérvix de mujeres atendidas en el INCAN durante el tratamiento por cáncer cervicouterino", bajo la Tutoría Académica de la Dra. Ninfa Ramírez Durán, ha sido dirigido, revisado y discutido, por lo que se ha considerado **DICTAMINARLO COMO APROBADO**, ya que reúne los requisitos que exige el Artículo 75 del Reglamento de Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma del Estado de México.



Paseo Toluca s/n esq. Jesús Carranza
col. Moderna de la Cruz. C.P. 50180
Toluca, Estado de México
Tel. (722) 2706270 / 2702367
feyo@uaemex.mx



INDICE

	Pág.
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Microbiota y microbioma.....	1
1.2. Microbiota bacteriana cervicovaginal.....	3
1.2.1. Microbiota bacteriana cervicovaginal saludable.....	4
1.2.2. Microbiota bacteriana cervicovaginal no saludable.....	6
1.2.2.1. Microbiota bacteriana cervicovaginal y Virus del Papiloma Humano.....	7
1.3. Cáncer cervicouterino.....	9
1.3.1. Pautas de tratamiento del cáncer cervicouterino.....	10
1.4. Microbiota bacteriana cervicovaginal y cáncer cervicouterino.....	13
1.5. Impacto de la terapia antineoplásica en la microbiota cervicovaginal.....	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPOTESIS.....	19
5. OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	20
6. DISEÑO METODOLÓGICO.....	21
6.1. Diseño de estudio.....	21
6.2. Universo y muestra.....	21
6.3. Criterios de inclusión.....	21
6.4. Criterios de exclusión.....	22
6.5. Variables.....	22
6.6. Material y método.....	23
6.6.1. Conformación de grupos de estudio.....	23
6.6.2. Obtención de muestras.....	23
6.6.3. Aislamiento de bacterias cultivables.....	24
6.6.4. Obtención de biomasa.....	25
6.6.5. Protocolo de extracción de ADN de cepas.....	25

6.6.6.	Electroforesis para visualización de ADN.....	26
6.6.7.	Protocolo de amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR	26
6.6.8.	PCR-RFLP (Ribotipificación mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción) de 16S rRNA	28
6.6.9.	Secuenciación e identificación bacteriana.....	29
6.7.	Análisis de datos.....	29
6.8.	Aspecto ético.....	30
7.	RESULTADOS.....	31
7.1.	Capítulo de libro aceptado.....	31
7.1.1.	Título del capítulo de libro.....	31
7.1.2.	Página frontal del manuscrito.....	31
7.1.3.	Carta de aceptación.....	32
7.1.4.	Resumen.....	33
7.1.5.	Apartados del capítulo de libro.....	33
7.2.	Primer Artículo enviado.....	51
7.3.	Segundo artículo enviado.....	52
8.	RESULTADOS ADICIONALES.....	53
8.1	Patrones de restricción de las especies bacterianas identificadas en todo el proyecto de investigación.....	53
9.	DISCUSIÓN GENERAL.....	57
10.	CONCLUSIONES GENERALES.....	63
11.	BIBLIOHEMEROGRAFÍA UTILIZADA.....	64
12.	ANEXOS.....	76

RESUMEN

Introducción: El cáncer cérvicouterino es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, constituyendo un problema de salud pública. Generalmente es detectado en etapas localmente avanzadas, por lo que el estudio de los factores que puedan intervenir en su establecimiento, desarrollo y prevención es de suma importancia. El entorno cervicovaginal es un hábitat compuesto por una gran cantidad de simbiosis humanos, la mayoría de los cuales son bacterias. Estudios previos han encontrado que el papel de estas bacterias es trascendental para conservar la salud cervicovaginal, sin embargo, el estudio de la composición de la microbiota de cérvix en pacientes con cáncer cérvicouterino localmente avanzado y sometidas a tratamiento antineoplásico es un tema que actualmente no se ha abordado. El objetivo del presente trabajo fue comparar la microbiota de cérvix de mujeres con cáncer cérvicouterino localmente avanzado respecto a la microbiota de cérvix de mujeres sin cáncer cérvicouterino y detectar cambios en ella durante el tratamiento antineoplásico.

Material y métodos: Se realizó un estudio descriptivo, longitudinal, prospectivo y comparativo. Se incluyeron mujeres con cáncer cérvicouterino localmente avanzado de reciente diagnóstico, con un plan de tratamiento basado en quimioterapia, radioterapia de haz externo y braquiterapia y mujeres con citología cervical negativa. Se tomaron muestras de fluido cervicovaginal mediante hisopado. Se aislaron cepas bacterianas a las que se les realizó extracción de ADN, amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR y tipificación mediante RFLP, a partir de cuyos resultados se eligieron cepas representativas para secuenciación. Se recopiló secuencias consenso y se compararon con secuencias depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), así como la base de datos pública de EzTaxon.

Resultados: Las bacterias identificadas pertenecen a 3 phyla: firmicutes, proteobacteria y actinobacteria. Se encontraron 14 géneros y 33 especies bacterianas, distribuidas en distintas proporciones a lo largo de las etapas evaluadas.

Conclusiones: Se detectaron cambios en la microbiota de cérvix de mujeres con cáncer cérvicouterino localmente avanzado respecto a la microbiota de cérvix de mujeres sin

cáncer cérvicouterino y esta también cambió durante y después de los tratamientos antineoplásicos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Microbiota y microbioma

Los microorganismos son posiblemente los primeros seres que habitaron el planeta tierra. Actualmente suponen una cifra que oscila entre 300,000 y 1,000,000 de especies y son fundamentales en la autorregulación del planeta¹. En la actualidad sólo una pequeña fracción de todas las bacterias se ha aislado y caracterizado, sin embargo, con la aplicación de técnicas de biología molecular se puede explorar la diversidad microbiana y analizar la estructura de las comunidades microscópicas. Con esta base, se han establecido dos conceptos importantes: microbiota y microbioma².

Se denomina microbiota normal (antiguamente flora normal), nativa, indígena o autóctona a aquellos microorganismos que habitan normalmente en la mayoría de los seres humanos sanos. Dentro de sus acciones benéficas se ha reportado la producción de sustancias bactericidas que impiden el sobrecrecimiento de otras bacterias³, la saturación de receptores en las mucosas que evita el ingreso de gérmenes exógenos⁴ y la síntesis de vitaminas que ayudan a convertir pigmentos y sales biliares en el intestino⁵.

En cuanto a sus efectos nocivos, está establecido que la presencia de una gran cantidad de bacterias en ciertos nichos ecológicos predispone a que, en algunas circunstancias, las bacterias puedan salir de su hábitat e ingresar en otros nichos con la consiguiente producción de patologías denominadas infecciones endógenas^{2,6}.

Es posible clasificar a la microbiota normal en dos tipos:

1. Invariable o residente, formada por ejemplares relativamente fijos de microorganismos que, si por alguna causa desaparecen, vuelven inmediatamente al eliminar dicho factor⁶.
2. Transitoria, constituida por gérmenes que ocasionalmente llegan al huésped, provenientes del medio ambiente y sólo permanecen en las mucosas o piel durante algunas horas o días⁶.

Hasta hace algunos años, el concepto de microbiota era un paradigma dominante en la medicina, considerando a los microorganismos como “extranjeros” y que llevó a la opinión imperiosa de que la eliminación de los patógenos sobresalientes resultaría en la mejora de la enfermedad. Sin embargo, este punto de vista está cambiando ya que los resultados de algunas observaciones coinciden en que los humanos sirven como sede de los microorganismos y que viven siendo una comunidad en perfecta armonía y en co-evolución. De esta nueva forma de abordar la relación microorganismo-humano ha surgido el concepto de microbioma².

La definición de microbioma fue sugerida por primera vez por Joshua Lederberg⁷ en el año 2001, quien acuñó el término para nombrar a la comunidad ecológica, comensal y simbiótica de microorganismos que comparten el espacio corporal del ser humano. Esta comunidad influye en la fisiología a través de procesos relacionados con el desarrollo,⁸ la nutrición,⁹ la inmunidad,¹⁰ y la resistencia a los patógenos^{10, 11}.

Con este concepto como antecedente, fue creado el Proyecto del Microbioma Humano o HMP (del inglés Human Microbiome Project)¹², que se inició para investigar la naturaleza y el alcance de las comunidades microbianas que viven en y sobre el cuerpo humano para poder comprender mejor su papel en la salud y enfermedad. Dicho proyecto tuvo dos objetivos principales:

1. Demostrar la viabilidad de caracterizar dicha comunidad lo suficientemente bien como para permitir un estudio posterior de la variación de acuerdo con la población, el genotipo, la enfermedad, la edad, la nutrición, la medicación, el medio ambiente y su influencia sobre la enfermedad¹².
2. Proporcionar recursos y desarrollos tecnológicos que permitan este tipo de estudios, creando amplias oportunidades para mejorar la salud humana a través del monitoreo o manipulación del microbioma humano¹².

Para la identificación de especies, las principales técnicas utilizadas en el HMP, han sido:

- a) Secuenciación del gen 16S rRNA, amplificado por PCR¹³.
- b) Huellas moleculares¹³.
 - DGGE (del inglés: “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).
 - TGGE (del inglés Temperature Gradient Gel Electrophoresis).
- c) Marcadores moleculares multilocus¹³.
 - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).
 - AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).
- d) Técnicas libres de hibridación basadas en sondas de oligonucleótidos como la Hibridación Fluorescente in situ (FISH)¹⁴.

La mayoría de los estudios realizados acerca del microbioma humano se han centrado en una región específica o sistema de órganos del cuerpo humano. El estudio más grande hasta la fecha, realizado por el HMP, tomó en cuenta cinco regiones corporales de adultos sanos: vías respiratorias, piel, cavidad oral, tracto gastrointestinal y vagina¹⁵.

Con lo ello, se demostró que el cuerpo humano alberga microorganismos que habitan las superficies y cavidades expuestas o conectadas con el medio ambiente externo, que cada sitio del cuerpo incluye comunidades ecológicas de especies microbianas que existen en relación mutua con el anfitrión y que los tipos de organismos presentes son altamente dependientes de las condiciones ambientales reinantes y de los factores del huésped variando de un sitio a otro¹⁶.

1.2. Microbiota bacteriana cervicovaginal

La microbiota cervicovaginal parece ser de suma importancia en la prevención de una serie de enfermedades urogenitales, como la vaginosis bacteriana (VB)¹⁷, infecciones por hongos,¹⁸ infecciones de transmisión sexual^{19, 20} e infecciones del tracto urinario²¹. Los métodos de cultivo y de microscopía aplicados al estudio de la microbiota vaginal lo atribuyen a las bacterias productoras de ácido láctico, principalmente *Lactobacillus spp.*, que comúnmente habitan en la vagina.

Estas especies pueden jugar un papel clave de protección mediante la reducción del pH del medio ambiente, a través de la producción de ácido láctico, que mantiene un ambiente inhóspito para muchas bacterias y que se correlaciona negativamente con VB, y con la producción de diversos compuestos como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), antibióticos radicales tóxicos, bacteriocinas y a través de la exclusión competitiva.^{18, 22-24}

Hasta antes del advenimiento del uso de técnicas de base molecular, los *Lactobacillus* solamente podían ser identificados a nivel de género. En 1892, Döderlein²⁵ publicó una monografía en la que afirmaba que los organismos obtenidos de la vagina humana eran una fuente de ácido láctico que podría inhibir el crecimiento de patógenos *in vitro* e *in vivo*. En 1928, Thomas²⁶ identificó el bacilo de Döderlein como *Lactobacillus acidophilus*, añadiendo que era o bien un grupo característico de especies relacionadas, o una especie que se sometió a una notable transformación.

Para 1980, de acuerdo con la observación de Thomas, los organismos previamente conocidos como *L. acidophilus* demostraron ser un grupo que posteriormente fue dividido en seis especies de acuerdo a su DNA: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus johnsoni*. Todas ellas, especies homofermentativas obligadas que pertenecen al grupo *L. acidophilus*. Así mismo, *L. jensenii* pertenece al mismo grupo filogenético y se ha añadido recientemente *L. iners*.²⁷

En la actualidad las especies estrechamente relacionadas dentro del grupo de *Lactobacillus acidophilus* siguen siendo difíciles de diferenciar por métodos fenotípicos, subestimando la diversidad de la microbiota vaginal. Es por ello y debido a su importante papel en la salud y la enfermedad, que se ha centrado considerable atención a la identificación de los *Lactobacillus* utilizando medios genotípicos.²⁸

1.2.1. Microbiota bacteriana cervicovaginal saludable

Más de 120 especies de *Lactobacillus* han sido identificadas, y más de 20 especies se han detectado en la vagina, no obstante, sólo uno o dos de ellos, de una serie de tres o cuatro especies, principalmente: *L.crispatus* y *L. iners*, *L. jensenii* y *L. gasseri*, son dominantes, mientras que otras especies son raras y tienden a ser filotipos nuevos²⁹⁻³².

Al respecto, en un estudio realizado en el 2011, donde se analizaron muestras vaginales de 396 mujeres, asintomáticas, sexualmente activas que equitativamente representaron cuatro grupos étnicos: blanco (n=98), negro (n=104), asiático (n=97), e hispano (n=97), Ravel y col.³³ demostraron que la microbiota vaginal saludable se puede dividir en cinco grandes grupos microbianos, designados: I, II, III, IV y V. De acuerdo con los resultados de este estudio, las comunidades microbianas pertenecientes al grupo I fueron dominadas por *L. crispatus*, las del grupo II por *L. gasseri*, las del grupo III por *L. iners* y el grupo V por *L. jensenii*. Las comunidades más diversas fueron las del grupo IV, caracterizado por presentar bacterias anaerobias, incluyendo *Prevotella spp.*, *Dialister spp.*, *Atopobium spp.*, *Gardnerella spp.*, *Megasphaera spp.*, y *Peptoniphilus spp.*³³.

En cuanto a la evaluación de la relación entre el origen étnico y la composición de la comunidad bacteriana vaginal los resultados mostraron que los perfiles microbianos vaginales de las mujeres asiáticas corresponden al grupo I, las mujeres blancas al grupo II, y tanto las mujeres hispanas como las mujeres de raza negra al grupo IV. El grupo V estuvo representado con porcentajes menores al 10% en todos los grupos étnicos³³. Las razones de estas diferencias son desconocidas, pero se puede especular que la composición de especies de las comunidades vaginales podría regirse por diferencias determinadas por los hospedadores y su medio ambiente.

Así mismo, en un estudio realizado en mujeres suecas sanas, fue demostrado que 18 de 23 muestras estudiadas tuvieron microbiota vaginal dominada por una única especie de lactobacilos y sólo cinco mujeres tenían dos diferentes especies. Las únicas especies detectadas fueron *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, y *L. jensenii*. En un estudio de seguimiento sólo una mujer fue colonizada por más de dos especies, cuatro fueron colonizadas por dos especies diferentes y 17 fueron colonizadas por una sola especie³⁴.

Una gran variedad de publicaciones han demostrado que una proporción significativa de entre el 7 y el 33% de mujeres sanas carecen de números apreciables de especies de *Lactobacillus* en la vagina y que estos pueden ser sustituidos por otras bacterias productoras de ácido láctico como *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* y *Leptotrichia spp.*³⁵,³⁶. Por lo tanto, aunque la estructura de las comunidades puede diferir entre las poblaciones, la salud se puede mantener siempre y cuando siga existiendo la producción de ácido láctico. La ausencia de *Lactobacillus spp.* o la presencia de ciertos organismos tales como *G.vaginalis*, o especies de *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Pseudomonas* y *Streptococcus*, podría no constituir un estado anormal³⁷.

En 2011, Smith y col³⁸. realizaron una comparación de la microbiota cervical mediante 3 diferentes métodos de secuenciación. Amplificaron las regiones V6 y V6-V9 del gen 16SrRNA derivado de muestras cervicales, obtenidas mediante hisopos de dacrón, de 10 mujeres a las que se les tomaron muestras sucesivas durante un período de 5-7 años. La secuenciación fue llevada a cabo utilizando tres plataformas diferentes: Sanger, Roche 454, e Illumina HiSeq 2000. El estudio concluyó que la microbiota cervical parecía tener relativa estabilidad durante largos períodos de tiempo, (5-7 años), con solo algunas fluctuaciones entre un pequeño número de comunidades definidas.

Este aspecto de la microbiota vaginal aún no está claro porque los estudios generalmente no abordan si alguna proporción de mujeres catalogadas como sanas son pacientes en transición hacia o desde alguna patología cervicovaginal o si tienen dicha patología de forma asintomática. Por ejemplo, un estudio molecular reciente muestra que *G. vaginalis*, anaerobio relacionado con la presencia de vaginosis bacteriana, puede producir dominancia transitoria en mujeres sanas como consecuencia de perturbaciones tales como aumento de pH durante la menstruación, sin que ello signifique la presencia de enfermedad³⁹.

1.2.2. Microbiota bacteriana cervicovaginal no saludable

En comparación con la microbiota cervicovaginal sana dominada por *Lactobacillus*, una microbiota vaginal anormal o no saludable, se asocia comunmente con un aumento de la diversidad de las especies, en su mayoría patógenas^{40,41}. La presencia de microbiota cervicovaginal anormal puede ocurrir debido a varios factores como:

- a) El establecimiento de infecciones de transmisión sexual (ITS).
- b) Colonización de un organismo que no es parte de la comunidad normal.
- c) Crecimiento excesivo o aumento de la virulencia de un organismo que es parte constitutiva de la microbiota normal.

Sin embargo, es preciso tener en cuenta que las alteraciones en la microbiota no implican necesariamente enfermedad o producción de síntomas. La enfermedad resulta de la interacción entre la virulencia microbiana, una dominación numérica, y la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador⁴².

Ling y col.⁴³ estudiaron en 2011 la relación entre las comunidades microbianas cervicovaginales y la incidencia de infecciones del tracto genital en mujeres, mediante la secuenciación del gen 16S *rRNA*. Analizaron 100 muestras vaginales y ectocervicales obtenidas mediante hisopos. La diversidad y la riqueza de la microbiota cervicovaginal fueron definidas mediante PCR, DGGE y PCR cuantitativa (qPCR). Los resultados identificaron 11 microorganismos que se asocian con las infecciones del tracto genital femenino. De igual forma, en 2013, Yeoman y col.⁴⁴ indicaron que la comunidad bacteriana y la diversidad de bacterias estrictamente anaerobias se incrementaron en mujeres con VB y fueron capaces de delinear claramente la diferencia entre VB-positiva y VB-negativa.

En 2014, Shiozaki y col.⁴⁵ realizaron un estudio para determinar las diferencias en la microbiota intestinal y vaginal de mujeres con parto prematuro y en mujeres sin trabajo de parto prematuro. Se amplificó el gen 16S *rRNA* a partir de muestras de ADN fecal y vaginal, se utilizó PCR y RFLP. Esta publicación concluyó que la disbiosis, durante el embarazo puede causar reacciones inflamatorias en el útero que conduciría a parto prematuro.

Así mismo, Gao y col.⁴⁶ en 2013, realizaron el primer estudio acerca de la asociación entre la infección por VPH y la microbiota vaginal, donde fueron analizadas 70 muestras vaginales tomadas con hisopos utilizando PCR y DGGE, concluyeron que la diversidad bacteriana y la composición microbiana en mujeres VPH positivas eran más complejas que en mujeres VPH negativas.

1.2.2.1. Microbiota bacteriana cervicovaginal y virus del papiloma humano

El cáncer cervicouterino es el tercer tipo de cáncer más común en las mujeres en todo el mundo y el Virus del Papiloma Humano (VPH) es considerado el agente causal más importante de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y el adenocarcinoma cervical. La infección por VPH clínica y subclínica es la enfermedad de transmisión sexual (ETS) más común actualmente.⁴⁷

La infección asintomática del cuello uterino por VPH se detecta en el 5 al 40% de las mujeres en edad reproductiva. La infección por VPH es un fenómeno transitorio o intermitente, sólo a una pequeña proporción de mujeres positivas para un determinado tipo de VPH se le encuentra el mismo en evaluaciones posteriores⁴⁸.

Los virus papiloma son un género de virus agrupados juntos por su tumorigenicidad y homogeneidad de DNA^{49, 50}. La International Agency for Research on Cancer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica como “carcinogénicos” a los tipos 16 y 18, “probablemente carcinogénicos” a los tipos 31 y 33, y “posiblemente carcinogénicos” a otros tipos de VPH excepto 6 y 11^{51, 52}.

Se ha encontrado que la edad, el estado menopáusico y la terapia hormonal se asocian con el desarrollo y la persistencia de la infección por VPH, sin embargo, otros factores asociados son poco conocidos como la microbiota vaginal, la inmunidad de la mucosa y el nivel de estrógeno⁵³.

De acuerdo con Guo y col.⁵⁴, la presencia de vaginosis bacteriana predispone a las mujeres a la infección por el virus del papiloma humano. En comparación con las mujeres sin VB, aquellas positivas a esta patología tienen una menor eliminación de VPH. Dols y col.⁵⁵ en el año 2012, documentaron que, en las mujeres con infección por VPH, la prevalencia de *L. crispatus* se redujo significativamente y se produjo un cambio en la composición de lactobacilos.

Además, se ha reportado que la diversidad bacteriana en mujeres VPH positivas es más compleja que en mujeres VPH negativas. *Gardnerella vaginalis* y *L. gasseri* se han detectado con una frecuencia significativamente mayor en mujeres VPH positivas. De esta forma, la microbiota vaginal anormal podría actuar como un cofactor para la adquisición de VPH y por ende para la generación de cáncer cervicouterino⁵⁶.

1.3. Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Se define como una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, que se suceden en etapas de displasia leve, moderada y severa⁵⁷.

Entre los factores de riesgo documentados se encuentran: múltiples compañeros sexuales, multiparidad, presencia de virus de papiloma humano (VPH), tabaquismo y un estrato socioeconómico bajo.⁵³ Las variedades más frecuentes son: carcinoma epidermoide o de células escamosas con un porcentaje de entre el 70% y el 75%; adenocarcinoma con porcentajes de entre el 20% y el 25% y adenoescamoso con un 5%⁵⁹.

La historia natural de esta enfermedad implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales preinvasoras llamadas neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) en estadios I, II y III o carcinoma *in situ* (CIS), de acuerdo con la proporción del grosor del epitelio cervical comprometido^{57, 59}.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica el cáncer cervicouterino de acuerdo con su histología como sigue (Tabla 1)⁵⁹.

Tabla 1. Clasificación histológica de los tumores de cérvix uterino, OMS

Tumores epiteliales	Tumores mesenquimatosos y Tumores similares	Tumores mesenquimato-sos y epiteliales mixtos
- Tumores escamosos y precursores	Carcinoma adenoideo- quístico	- Leiomiomasarcoma
- Carcinoma de células escamosas de patrón no específico	- Carcinoma adenoideo basal	- Sarcoma del estroma endometrial de bajo grado
- Carcinoma de células escamosas de invasión temprana (microinvasor)	- Tumores neuroendocrinos	- Sarcoma endocervical indiferenciado
- Tumores glandulares y precursores	- Tumores misceláneos	- Sarcoma botroides
-Adenocarcinoma	- Tumores de células de tipo germinal	- Sarcoma alveolar de partes blandas
-Tumores melanocíticos	- Tumores de saco de Yolk	- Angiosarcoma
-Adenocarcinoma de invasión temprana	- Quístico dermoide	- Tumor maligno periférico de la vaina nerviosa
- Otros tumores epiteliales	- Teratoma quístico maduro	- Leiomioma
- Carcinoma adenoescamoso		- Rbdomioma genital
- Carcinoma variedad de células vítreas		- Nódulo posterior de células espinosas
		- Hematopoyéticos y linfoides

La asignación de estadios se basa en datos clínicos. Las reglas de estadificación clínica se basan en exploraciones ginecológicas realizadas por un experto. La etapa clínica inicialmente asignada debe mantenerse y permanecer inalterada, a pesar de los descubrimientos posteriores, incluso en casos de recurrencia⁶⁰. El sistema de estadificación utilizado actualmente es el que fue adoptado por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). El sistema de estadificación es útil sólo para fines comparativos y no debe ser tomado como una indicación del tratamiento. Cada caso clínico debe ser individualizado, considerado y apoyado por métodos de imagenología antes de proponer el mejor plan de tratamiento. En 2009, la FIGO revisó la estadificación de cáncer cervicouterino y estableció lo siguiente (Tabla 2)⁶¹.

Tabla 2. Estadificación del cáncer cervicouterino FIGO 2009.

Etapa	Descripción
I	Tumor confinado al cuello uterino
IA	Cáncer invasor identificado a través de un examen microscópico únicamente. La invasión se limita a la invasión del estroma medida con un máximo de 5 mm de profundidad y 7 mm de extensión horizontal.
IA1	Invasión estromal menor o igual a 3mm y extensión horizontal menor o igual a 7mm.
IA2	Invasión estromal mayor de 3mm pero menor de 5mm y extensión horizontal menor o igual a 7 mm
IB	Las lesiones clínicas se limitan al cérvix, o las lesiones preclínicas son mayores que en el estadio IA. Toda lesión macroscópicamente visible incluso con una invasión superficial es un cáncer de

	estadio IB.
IB1	Lesiones clínicas de tamaño máximo de 4 cm
IB2	Lesiones clínicas de tamaño superior a 4 cm.
II	Se extiende más allá del cérvix, pero sin alcanzar las paredes pelvianas. Afecta la vagina, pero no más allá de sus dos tercios superiores.
IIA	Tumor que invade fondo de saco, Ninguna afección parametrial evidente
IIA1	Menor de 4cm
IIA2	Mayor de 4 cm
IIB	Tumor con invasión parametrial sin llegar a invasión pélvica.
III	Se extiende hacia la pared pelviana. En el examen rectal, todas las zonas están invadidas por el cáncer entre el tumor y la pared pelviana. El tumor afecta el tercio inferior de la vagina. Todos los cánceres con una hidronefrosis o una disfunción renal son cánceres de estadio III.
IIIA	Ninguna extensión en la pared pelviana, pero afección del tercio inferior de la vagina.
IIIB	Extensión a la pared pelviana, hidronefrosis o disfunción renal.
IV	Se extiende más allá de la pelvis verdadera o invade la mucosa de la vejiga y/o del recto.
IVA	Extensión del tumor a los órganos pélvicos cercanos.
IVB	Extensión a los órganos distantes..

1.3.1. Pautas de tratamiento del cáncer cervicouterino

La correcta evaluación de cada una de las fases o estadios del cáncer es fundamental para determinar si la paciente se beneficiará con un tratamiento quirúrgico o con quimio-radioterapia concomitante. La cirugía se reserva para aquellos tumores menores o iguales al estadio IIA. Las mujeres con enfermedad en etapa temprana pueden someterse a una histerectomía radical, a una quimio-radioterapia concomitante o a ambas⁶². Por el contrario, aquellas pacientes que se encuentran en enfermedad avanzada con afectación parametrial sólo pueden ser tratadas con quimio-radioterapia concomitante (Tabla 3)^{59, 61-63}.

Tabla 3. Pautas de tratamiento del cáncer cervicouterino

Estadio	Cirugía	Quimio/radioterapia
1B<2cm	Histerectomía tipo Piver linfadenectomía Pélvica y peritoneal. Con contraindicación quirúrgica	Quimioterapia con radioterapia (45-50GY) Radioterapia (80-85GY)
II <2cm	Histerectomía tipo Piver linfadenectomía 17élvica y peritoneal. Con contraindicación quirúrgica	Quimioterapia con radioterapia (45-50GY) Radioterapia (80-85GY)
Estadios IB2, IIA >4cm, IIB, IIIA, IIIB, IVA	Con contraindicación quirúrgica	Quimio-Radioterapia concomitante y braquiterapia
Estadio IVB	Con contraindicación quirúrgica	Radioterapia y/o quimioterapia paliativos

Desafortunadamente, en aproximadamente la mitad de los casos, las pacientes con cáncer cervicouterino en México son diagnosticadas en un estadio clínico localmente avanzado^{62,64}. La razón de esto, de acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología de México está probablemente relacionada con la falta de cobertura de las pruebas de Papanicolaou y con el hecho de que las mujeres tienden a buscar atención médica mucho después de la aparición de los primeros síntomas.

Es por ello que el tratamiento quirúrgico, cuyo pronóstico es bastante favorable, sólo puede ser ofrecido a un pequeño porcentaje de pacientes, ya que a partir de la etapa clínica IB2, el tratamiento debe incluir preferiblemente quimio-radioterapia concomitante seguida de braquiterapia. Mediante este protocolo se ha demostrado que hay una relación inversa entre el tamaño del tumor y la probabilidad de controlar el cáncer. Esto se debe a que el efecto de la radiación depende de la cantidad de oxígeno en el tejido. Un tumor grande generalmente presenta áreas de necrosis y disminución del flujo sanguíneo. Esto da como resultado el compromiso de oxígeno lo que significa que se aplica menos daño por oxidación a los tejidos malignos⁵⁷.

Diversos ensayos clínicos han demostrado a lo largo de los últimos 20 años que el tratamiento estándar para pacientes con cáncer cervicouterino localmente avanzado (IB2-IVA) es la quimio-radioterapia concomitante por encima del uso exclusivo de radioterapia o el uso exclusivo de quimioterapia. El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América publicó una declaración sobre los beneficios de la quimiorradioterapia concurrente (QT/RT) comparada con la radioterapia sola, cambiando así la forma en que se trata el cáncer cervicouterino localmente avanzado^{65,66}.

Este tratamiento combinado se basa en el efecto sinérgico entre ambas modalidades: la quimioterapia actúa como un agente radio-sensibilizante que aumenta la susceptibilidad del tumor a los efectos de la radiación inhibiendo la reparación de las lesiones subletales y dañando las células en una fase radio-sensible específica⁶⁷. Además, el uso combinado de estos tratamientos hace que los efectos de la radiación sean menos dependientes del oxígeno.

Se ha encontrado que el cisplatino es el mejor radiosensibilizante. Este es un compuesto de platino de molécula pequeña. Originalmente se descubrió que inhibía el crecimiento bacteriano, específicamente de *Escherichia coli*, y luego se identificó como un agente anticancerígeno. El mecanismo molecular subyacente al efecto anticancerígeno mediado por cisplatino se asocia con múltiples vías que incluyen la destrucción de las células cancerosas al dañar el ADN, la inhibición de la síntesis de ADN, de la mitosis, y la inducción de la muerte celular apoptótica^{68, 69}. La dosis establecida es de 40 mg/m² de forma semanal durante 6 semanas⁶².

La radioterapia de haz externo implica el uso de radiación ionizante de rayos X y aceleradores de electrones, con el objetivo de eliminar el tumor sin destruir el tejido sano circundante. El mejor esquema se ha obtenido con una dosis superior a 45 Gy durante menos de 8 semanas; por lo tanto, la dosis de radioterapia establecida es de 50,4 Gy en 28 sesiones⁶².

De manera posterior al tratamiento con quimioterapia y radioterapia, el tratamiento estándar del cáncer cervicouterino localmente avanzado administra braquiterapia, un tipo de radioterapia que utiliza isótopos radiactivos que aplican la máxima dosis de radiación en un área circunscrita. Los isótopos son colocados cerca del tumor o se introducen en el mismo, con ello se reduce la radiación al tejido sano y se protegen las estructuras sanas adyacentes basándose en que la dosis recibida en la proximidad de una fuente decrece muy rápidamente al alejarse de ella⁶².

El radio fue el primer elemento utilizado en braquiterapia, sin embargo, actualmente se utilizan distintos elementos dependientes de la modalidad administrada. La International Commission on Radiation Units & Measurements (CRU) define tres modalidades dependientes de la tasa de dosis:

1. Baja tasa de dosis (LDR). Su rango de dosis es de 0,4-2 Gy/hora, utiliza como fuente de radiación Cesio 137, un radioisótopo con características similares al radio,

excepto que tiene una vida media menor, produciendo menos exposición ocupacional por parte de los proveedores de atención médica⁷⁰.

2. Media tasa de dosis o de dosis pulsada. Su rango de dosis es de 2-12 Gy/hora. Combina las ventajas físicas de una tasa de dosis alta y las ventajas radiobiológicas de una tasa de dosis baja. Entrega pulsos de radiación en intervalos de tiempo preestablecidos, utilizando como fuente de radiación Iridio 192⁷⁰.
3. Alta tasa de dosis. Administra una dosis superior a 12 Gy/hora. Utiliza iridio 192 como fuente de radiación. Entre sus ventajas, evita la exposición excesiva del personal encargado de la atención al paciente, permite optimizar la dosis, tener una mayor reproducibilidad y es un tratamiento ambulatorio⁷¹.

Varios estudios han encontrado que no hay diferencia en los resultados oncológicos o toxicidad entre la dosis baja y la dosis alta. Por lo tanto, independientemente de la dosis absoluta, la dosis biológica equivalente es igual para ambas modalidades⁷².

1.4. Microbiota bacteriana cervicovaginal y cáncer cervicouterino

A finales de la década de 1970 y principios de la década de 1980, se realizaron los primeros trabajos para determinar la microbiota bacteriana cervicovaginal asociada a la presencia de cáncer cervicouterino^{73, 74}. Estos estudios, basados en el cultivo y en la identificación bacteriana por métodos bioquímicos, concluyeron que existía disminución en el aislamiento de lactobacilos y aumento de enterobacterias, pero no llegaron a establecer conclusiones definitivas respecto al impacto del establecimiento de la patología y el tipo de comunidad bacteriana encontrada.

Con el advenimiento de la identificación bacteriana por métodos moleculares se han llevado a cabo algunos estudios para caracterizar la microbiota cervicovaginal en mujeres con lesiones cervicales, donde se demuestra que la diversidad microbiana aumenta conforme se incrementa la gravedad de la enfermedad, pero existe una considerable

disminución de la cantidad de *Lactobacillus* presentes. Los resultados de dichos estudios se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Microbiota cervicovaginal y cáncer cervicouterino: estudios antecedentes.			
Autores y año	Sujetos	Muestras	Conclusiones
Mead y col.⁷³ 1978.	Mujeres con cáncer cervicouterino invasivo	Hisopado cervico-vaginal	Las pacientes tenían una menor frecuencia de aislamiento de lactobacilos aerobios, <i>Staphylococcus epidermidis</i> y enterococos, y una mayor frecuencia de aislamiento de <i>Escherichia coli</i> y especies de Bacteriodes. La composición de la microbiota cervico vaginal fue parecida a la descrita en pacientes inmunodeprimidos.
Thadepalli y col.⁷⁴ 1982	Mujeres con Displasia, carcinoma <i>in situ</i> y Carcinoma invasivo	Biopsias cervicales	Las bacterias anaerobias son escasas y los bacilos gramnegativos anaerobios son raros en el carcinoma de cuello uterino temprano.
Oh y col.⁷⁵ 2015	Mujeres con VPH	Hisopado cervico-vaginal	Se encontró disbiosis bacteriana, caracterizada por el predominio de <i>A. vaginae</i> , <i>G. vaginalis</i> y <i>L. iners</i> y una escasez concomitante de <i>L. crispatus</i> . La combinación de disbiosis más VPH oncogénico puede aumentar el riesgo de neoplasia intraepitelial cervical.
Mitra y col.⁷⁶ 2015	Mujeres con NIC y cáncer invasivo	Hisopado cervico-vaginal	El aumento de la gravedad de la NIC se asoció con una mayor diversidad de microbiota vaginal y disminución de la abundancia relativa de <i>Lactobacillus spp.</i>
Piyathilake y col.⁷⁷ 2016	Mujeres con NIC y lesión intraepitelial de alto grado		Una condición caracterizada por una disminución de <i>Lactobacillus</i> con un aumento concomitante de bacterias anaeróbicas (p. Ej., Gardnerella, Prevotella y Clostridiales) se asoció con un mayor riesgo de eliminación tardía de la infección por VPH. La comunidad mucosa cervical dominada por <i>L. iners</i> y <i>Lactobacillus spp.</i> se asoció con neoplasia intraepitelial cervical de grado más alto en mujeres infectadas con HR HPV
Audirac-Chalifour y col.⁷⁸ 2016	Mujeres con NIC y cáncer cervicouterino	Biopsias	El microbioma cervical predominante en mujeres con citología normal fue <i>Lactobacillus crispatus</i> y <i>Lactobacillus iners</i> , mientras que con lesiones intraepiteliales escamosas fue <i>Sneathia spp.</i> . Existe aumento de la diversidad y una mayor abundancia relativa de <i>Sneathia spp.</i> , <i>Fusobacterium spp.</i> , lo cual se asoció con una mayor gravedad de la enfermedad. Las mujeres con NIC tienen una diversidad mayor de bacterias vaginales que los controles sanos.

Estos estudios han demostrado que la disbiosis microbiana puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de la infección por VPH y la neoplasia cervical. Ninguno de estos estudios aborda el análisis de la microbiota cervicovaginal de mujeres con cáncer localmente avanzado ni de los efectos que podría tener el tratamiento antineoplásico a nivel bacteriano.

1.5. Impacto de la terapia antineoplásica en la microbiota cervicovaginal.

La cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, han sido durante muchos años, la terapia estándar en el tratamiento contra el cáncer, incrementando notoriamente la supervivencia en el paciente oncológico. Sin embargo, pueden ocasionar un impacto negativo sobre el estado de salud general, afectando la calidad de vida del individuo.

Reportes previos han encontrado que las complicaciones asociadas al tratamiento contra el cáncer podrían estar vinculadas con un cambio en la cantidad y tipo de microorganismos, producto del tratamiento antineoplásico. Previo al establecimiento de la identificación bacteriana por métodos genéticos, se realizaron algunos estudios sobre la microbiota bacteriana cervicovaginal en pacientes con cáncer endometrial y cervicouterino tratadas con radioterapia y braquiterapia los resultados de dichos estudios se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto de tratamientos antineoplásicos sobre la microbiota cervicovaginal: estudios antecedentes.

Autores y año	Sujetos	Muestras	Conclusiones
Blythe JG. 1978	Mujeres sometidas a braquiterapia con Cesio.	Hisopado cervicovaginal	Los organismos cultivados fueron similares a los identificados como microbiota cervical normal. La frecuencia de los organismos pareció independiente de la cantidad de irradiación
Gerstner y col. 1982	Mujeres con cáncer de endometrio tratadas con braquiterapia de alta tasa	Biopsia transcervical	La media de microorganismos aumentó después del tratamiento. La administración intrauterina Iridio192 no esteriliza el endocérvix o el endometrio y pueden ocurrir infecciones después de la radioterapia intracavitaria.
Choo y col. 1984	Mujeres con carcinoma invasivo tratadas con radioterapia	Hisopado cervicovaginal	La radiación suprimió significativamente la cantidad de bacterias aisladas.
Gilstrap y col. 1986	Mujeres con carcinoma invasivo de cérvix, vagina y endometrio	Hisopado cervicovaginal	La radioterapia de haz externo tiene poca o ninguna influencia sobre los principales patógenos aeróbicos en el cuello uterino, la vagina o el recto.

Es importante aclarar que estos estudios están basados únicamente en la identificación bacteriana por métodos bioquímicos. Actualmente no se han encontrado investigaciones que hayan identificado por métodos moleculares, la microbiota cervicovaginal de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado, sometidas a tratamientos con quimioterapia, radioterapia pélvica y braquiterapia. Tampoco se ha indagado acerca de cómo los tratamientos antineoplásicos pueden afectar la composición de la microbiota cervicovaginal de estas mujeres.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Dentro de los factores asociados a su aparición, la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) es una condición necesaria pero no suficiente para su desarrollo. Las diferencias individuales del hospedador pueden actuar como cofactores que determinen el establecimiento, la persistencia, el progreso y/o la curación de la lesión cervical.

La superficie cervicovaginal está cubierta por un epitelio de protección colonizado por bacterias y otros microorganismos. De manera común, las diversas especies de lactobacilos se asocian con la salud cervicovaginal, pero su papel no está aún bien definido. Con los resultados del proyecto del microbioma humano se ha establecido un panorama general de la microbiota que compone dicho ecosistema en estados de salud y asociada a algunas patologías comunes, como la vaginosis bacteriana, la infección por VPH y la neoplasia intraepitelial cervical, que revelan modificaciones en la composición bacteriana, con consecuencias hasta ahora poco claras.

Siguiendo la historia natural de la enfermedad, actualmente no se han encontrado investigaciones que hayan identificado por métodos moleculares, la microbiota bacteriana cervicovaginal de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado, sometidas a tratamientos con quimioterapia, radioterapia pélvica y braquiterapia. Tampoco se ha indagado acerca de cómo los tratamientos antineoplásicos pueden afectar la composición de la microbiota bacteriana cervicovaginal de estas mujeres y las consecuencias que de ello puedan derivar.

Para abordar esta problemática, se ha planteado la siguiente pregunta de investigación: ¿Existen variaciones en la microbiota de cérvix de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado respecto a la microbiota de cérvix presente en mujeres sin cáncer cervicouterino; y dicha microbiota cambia durante los tratamientos antineoplásicos?

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino es responsable de alrededor de 250 mil muertes por año, 80% de las cuales ocurren en países en vías de desarrollo. Las tasas más altas de incidencia están reportadas en África, Sudamérica y Asia⁶¹. A nivel mundial representa el séptimo cáncer más común en humanos y el cuarto cáncer más común en mujeres⁸³.

En México, es la segunda causa de muerte en mujeres debido a que las etapas localmente avanzadas (IB-2 a IV-A) son las que tienen mayor prevalencia⁸³⁻⁸⁵. Durante el periodo 1990-2000 se reportaron un total de 48,761 defunciones por CaCu, lo que representa un promedio de 12 mujeres fallecidas cada 24 horas, con un crecimiento anual de 0.76%⁸⁶.

Diversos factores están ampliamente estudiados y asociados al establecimiento de la patología, como la infección por VPH, hábitos sexuales de riesgo^{87,88}, factores reproductivos^{87, 89, 90} y tabaquismo^{91, 92}. Sin embargo, otras características menos estudiadas como el tipo de microbiota bacteriana cervicovaginal o la alteración de su diversidad, también pueden estar implicadas en el desarrollo de este padecimiento⁷⁶.

En los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la composición bacteriana en distintos nichos del cuerpo humano debido a la implementación de métodos moleculares para la identificación microbiana. De tal forma que su uso, tiene el potencial de cambiar la perspectiva de la diversidad microbiana y de permitir describirla, monitorearla y controlarla para entender su relación con el ser humano.

El abordaje de una variable poco estudiada y el uso de métodos de biología molecular en el presente proyecto de investigación permitirá generar los primeros conocimientos acerca del ecosistema bacteriano de cérvix de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado sometidas a tratamiento antineoplásico. Proporcionando con ello datos acerca de la presencia o ausencia de bacterias que favorecen la salud cervical y permitirá detectar el establecimiento de patógenos potenciales. Lo anterior puede ayudar a tener un mejor entendimiento del papel que juega la microbiota bacteriana de cérvix asociada al cáncer cervicouterino.

4. HIPÓTESIS.

Hipótesis de trabajo.

Existen variaciones en la microbiota presente en cérvix de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado respecto a la microbiota presente en cérvix de mujeres sin cáncer cervicouterino; y dicha microbiota cambia durante los tratamientos antineoplásicos.

Hipótesis nula.

No existen variaciones en la microbiota presente en cérvix de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado respecto a la microbiota presente en cérvix de mujeres sin cáncer cervicouterino; y dicha microbiota no cambia durante los tratamientos antineoplásicos.

5. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Determinar las variaciones de la microbiota de cérvix de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado respecto a la microbiota presente en cérvix de mujeres sin cáncer cervicouterino, así como durante y después del tratamiento antineoplásico.

Objetivos específicos.

- Recolectar muestras de exudado cervicovaginal de mujeres sin cáncer cervicouterino al momento de diagnosticar citología cervical negativa.
- Recolectar muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado, antes, durante y después de los tratamientos antineoplásicos.
- Aislar bacterias aerobias a partir de las muestras de exudado cervicovaginal de ambos grupos de estudio.
- Extraer ADN de cepas obtenidas a partir de muestras de exudado cervicovaginal de ambos grupos de estudio.
- Realizar una tipificación genotípica de la microbiota de cérvix presente en ambos grupos de estudio utilizando la técnica de RFLP.
- Identificar cepas representativas por análisis de secuenciación del gen 16S rRNA.
- Comparar la microbiota de cérvix identificada en ambos grupos de estudio y en todas las etapas de medición.

6. DISEÑO METODOLÓGICO.

6.1 Diseño de estudio.

Observacional, descriptivo, comparativo, longitudinal, prospectivo.

6.2 Universo y muestra

Universo: mujeres con cáncer cervicouterino

Población: mujeres con cáncer cervicouterino adscritas al Instituto Nacional de Cancerología de México.

Muestreo: no probabilístico, por conveniencia

Tamaño de la muestra:

Grupo no expuesto: n=68.

Grupo expuesto: n=68.

6.3 Criterios de inclusión:

Grupo no expuesto.

- Mujeres acompañantes (familiares o vecinas) de las pacientes que conforman el grupo expuesto.
- Mujeres con citología cervical negativa, confirmada en el Instituto Nacional de Cancerología.
- Mujeres mayores de 18 años.
- Mujeres que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

Grupo expuesto.

- Mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado (IB2 a IVA), de reciente diagnóstico, confirmado histológicamente, adscritas al Instituto Nacional de Cancerología de México (INCAN).
- Mujeres mayores de 18 años.
- Mujeres cuyo tratamiento antineoplásico estuvo basado en el uso de quimioterapia, radioterapia y braquiterapia.
- Mujeres que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

6.4. Criterios de exclusión

- Mujeres embarazadas
- Mujeres que utilizaron antimicrobianos y/o antifúngicos sistémicos y/o locales en los últimos 30 días.
- Mujeres que tuvieron relaciones sexuales coitales 48 horas antes de la toma de muestra.
- Mujeres que utilizaron duchas vaginales.
- Mujeres que estuvieran menstruando durante la toma de muestras.

Eliminación

- Mujeres que abandonaron el tratamiento.
- Mujeres que decidieron seguir el tratamiento pero no quisieron continuar en el estudio.

6.5. Variables

Tabla 6. Operacionalización de variables				
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Variable dependiente				
Microbiota de cérvix	Conjunto de microorganismos que viven de manera natural y sin causar daño en la región cervical	Bacterias presentes en la región cervicovaginal de mujeres con cáncer cervicouterino y sin cáncer cervicouterino	Cualitativa Nominal	Género y especie
Variables independientes				
Cáncer cervicouterino	Cáncer que se forma en los tejidos del cuello	Cáncer del cuello uterino en etapas localmente avanzadas	Cualitativa Nominal	Presencia o ausencia

	uterino	IB2-IVA		
Quimioterapia	Tratamiento médico que consiste en la aplicación de sustancias químicas al organismo.	Administración de cisplatino como radiosensibilizante para el tratamiento de cáncer cervicouterino localmente avanzado.	Cualitativa nominal	Presente o ausente
Radioterapia	Terapia basada en radiación ionizante que impide el desarrollo, crecimiento, o proliferación de células tumorales malignas.	Radio terapia externa a pelvis total para el tratamiento de cáncer cervicouterino localmente avanzado.	Cualitativa Nominal	Presente o ausente
Braquiterapia	Tratamiento radioterapéutico donde isótopos radioactivos se colocan dentro o cerca de la zona que requiere tratamiento.	Braquiterapia de contacto para el tratamiento de cáncer cervicouterino localmente avanzado	Cualitativa nominal	Presente o ausente

6.6. Material y método.

6.6.1. Conformación de grupos de estudio.

Se conformaron dos grupos de estudio: grupo no expuesto y grupo expuesto (a la enfermedad y al tratamiento antineoplásico), de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión ya establecidos. A cada integrante se le explicó de manera detallada el tipo de investigación que se realizaría, la forma en que se llevaría a cabo y la importancia de su participación. Todas aquellas mujeres que aceptaron participar firmaron el consentimiento informado correspondiente (Anexos 1 y 2). Posteriormente, se aplicó un cuestionario para evaluar variables gineco-obstétricas y socioeconómicas de importancia (Anexo 3).

6.6.2. Obtención de muestras.

Se tomaron muestras de exudado cervicovaginal mediante hisopado, en posición ginecológica y bajo visión directa.

Grupo no expuesto:

1.- Medición basal: se tomó una muestra única al momento de diagnosticar citología cervical negativa.

Grupo expuesto:

Se tomaron 4 muestras de seguimiento desde el diagnóstico hasta la finalización del periodo de vigilancia posterior al término del tratamiento antineoplásico de la siguiente manera:

1. Medición basal: Se tomó la muestra inicial al momento de establecer el diagnóstico de presencia de cáncer cervicouterino localmente avanzado.
2. Medición post-quimioterapia radioterapia: Una vez diagnosticadas, las pacientes esperaron 4 semanas antes de iniciar el tratamiento con quimioterapia y radioterapia. Una vez iniciado este tratamiento, tuvo una duración de 5 semanas y a su término, se tomó la segunda muestra.
3. Medición post-braquiterapia: Al finalizar quimioterapia y radioterapia, las pacientes tuvieron dos semanas de descanso antes de iniciar el tratamiento con braquiterapia, el cuál duró 4 días. Al término de este, las pacientes tuvieron 6 semanas de descanso y posteriormente se valoró la respuesta al tratamiento mediante, tomografía y citología cervical, en este momento se tomó la tercera muestra.
4. Medición post-vigilancia: Si la respuesta fue persistencia de la enfermedad, las pacientes tomaron 8 semanas de descanso antes de iniciar quimioterapia de 2ª línea. Si la respuesta al tratamiento fue curación, las pacientes tomaron 12 semanas de descanso como periodo de vigilancia antes de darlas de alta. Se tomó la cuarta muestra después del periodo de descanso previo a quimioterapia de segunda línea o después del periodo de vigilancia previo al alta, según correspondiera.

Los hisopos fueron colocados de manera individual en un tubo con solución salina isotónica y llevados al Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la UAEM en un contenedor hermético con tapa de rosca que contenía bolsas de gelatina congelada (cadena de frío).

6.6.3. Aislamiento de bacterias cultivables

Una vez en el laboratorio y bajo condiciones de asepsia, las muestras fueron inoculadas mediante el siguiente protocolo:

- Se desgarraron las fibras del hisopo mediante un bisturí con hoja del n°11 y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- Se agregaron 1000 µl de la solución salina contenida en el tubo con el hisopo.
- El tubo se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos.
- Se descartaron 500 µl del sobrenadante.
- Los restantes 500 µl se dividieron de la siguiente forma:
 - 200 µl se inocularon en una caja Petri con agar sangre.
 - 200µl se inocularon en una caja Petri con agar BHI.
 - 100 µl se colocaron en un criotubo junto con las fibras del hisopo, se agregaron 150 µl de glicerol al 20% y se congelaron para su conservación a -20 °C.
- Las cajas Petri inoculadas se incubaron a 37°C durante 48 horas.
- Posteriormente se seleccionaron las colonias representativas y se purificaron para obtener colonias aisladas.

6.6.4. Obtención de biomasa

Para la obtención de biomasa, los cultivos puros fueron inoculados en cajas Petri con agar infusión cerebro corazón mediante estría masiva, se incubaron a 37°C por 48 hrs. La recuperación de biomasa se realizó mediante raspado del crecimiento bacteriano con asa bacteriológica, recolectada en tubos Eppendorf de 1.5 ml con solución salina estéril al 0.85%.

Los tubos con la biomasa recolectada fueron centrifugados a 14,000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet resultante fue utilizado para la extracción de ADN de las cepas.

6.6.5. Protocolo de extracción de ADN de cepas.

Se utilizó el kit Promega Wizard® Genomic No. de catalogo A1120.

- Se resuspendió el pellet de células con 480µL de EDTA 0.5M
- Se adicionaron 120µl de lizosima (10mg/ml) al pellet resuspendido, se mezcló cuidadosamente.
- Se incubó la muestra a 37° C por 1 hora, se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos y se removió el sobrenadante.
- Posteriormente se agregaron 600µl de solución de lisis nuclear del paquete de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” mezclando cuidadosamente.
- La muestra se incubó a 80 °C durante 5 minutos en baño maría y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se adicionaron 3 µL de solución de RNAsa del paquete de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic”, se mezcló por el método de inversión 3 veces.
- Se incubó el tubo a 37 °C por 1 hora, se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se añadieron 200µl de solución de precipitación de proteínas del paquete de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” al lisado tratado con RNAsa, se agitó con el vortex vigorosamente durante 20 seg. para mezclar.
- Se incubó la mezcla en hielo durante 5 min.
- Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 3 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 ml limpio y estéril conteniendo 600 µl de isopropanol.
- Se mezcló suavemente hasta que se observó la formación de hebras de ADN visibles.
- Se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos.
- Se drenó cuidadosamente el tubo en papel absorbente, se adicionaron 600 µl de etanol al 70% y se invirtió el tubo varias veces delicadamente para no despegar el pellet de ADN.
- Se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos, se eliminó cuidadosamente el etanol, y se dejó secar el tubo durante 10 a 15 min.
- Finalmente se agregaron 100 µl de solución de rehidratación del paquete de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” y se conservó a 4° C durante 24 horas.

6.6.6. Electroforesis para visualización de ADN

Para observar la presencia e integridad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Conda Pronadisa, N° de catálogo: 8100.10), teñido con bromuro de etidio (SIGMA N° de catálogo: E7637-1G), bajo las siguientes condiciones: 120V durante 40 minutos con buffer TAE (TAE buffer 1X Invitrogen, N° de catálogo: 24710-030) y marcador de peso molecular de ADN de 1 kb (Thermo scientific, N° de catálogo: 5M0311).

Una vez verificada la presencia e integridad del ADN, este se utilizó para amplificar el gen 16S rRNA mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

6.6.7. Amplificación del Gen 16S rRNA mediante PCR

La amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR, se realizó en un termociclador MaxyGenII (Axygen®) utilizando Taq ADN Polimerasa (My taq, Bioline). Se utilizaron las siguientes secuencias de nucleótidos, como primers universales:

27f: 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

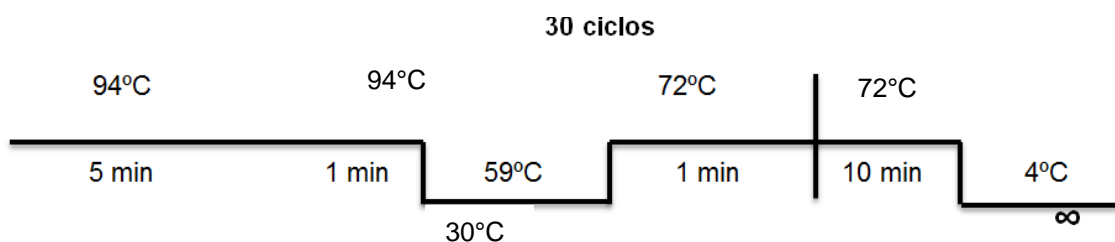
1492r: 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

El protocolo utilizado fue el siguiente:

Volumen total de la reacción: 25ml		
Reactivos	Concentración final del reactivo	Cantidad de reactivo
H ₂ O	-	14.3µl
Buffer PCR (10x)	1.00	2.5µl
Taq polimerasa 5U/ml	1.00	0.2µl
Primer 8F 10mM	1.00	2.5µl
Primer 1492R 10mM	1.00	2.5µl
ADN	-	3

Las condiciones usadas en el ciclo térmico para la amplificación del gen fueron las siguientes: Desnaturalización inicial, un ciclo de 5 minutos a 94°C y 29 ciclos:

desnaturalización 1 minuto a una temperatura de 94°C; alineación 30 segundos a 59°C; extensión 1 minuto a 72°C. Extensión final de 10 minutos a 72°C.



Los fragmentos amplificados fueron observados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (TAE buffer, 120V, 40min) teñido con bromuro de etidio (SIGMA N° de catálogo: E7637-1G), bajo las siguientes condiciones: 120V durante 45 minutos con buffer TAE (TAE buffer 1X Invitrogen, N° de catálogo: 24710-030).

Se verificó que el tamaño del producto de amplificación fuera de aproximadamente 1500 pb, utilizando un marcador de peso molecular de ADN de 1 kb (Thermo scientific, N° de catálogo: 5M0311). Los amplicones resultantes fueron utilizados para la ribotipificación mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP).

6.6.8. Ribotipificación mediante PCR-RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción) de 16S rRNA

El producto de PCR fue sometido a un análisis de restricción enzimática con el fin de tipificar genéticamente las cepas mediante RFLP. Para ello, se utilizaron las enzimas: MSPI (Promega, No. de catálogo: R6401) y RSAI (Promega, No. de catálogo: R6371), cuyas secuencias específicas de corte son C/CGG y GT/AC, respectivamente.

En un tubo Eppendorf estéril, se digirieron 10 µl de los amplicones del gen 16S rRNA con la enzima MSPI (Promega, N° de catálogo: R6401). La mezcla de reacción consistió en 7.6 µl de agua libre de nucleasas (Merck Millipore, N° de catálogo: LSKNF0500), 2 µl de Buffer B 10X Buffer (Promega, N° de catálogo: R002A), 0.2 µl de Albúmina sérica bovina

acetilada (Promega, N° de catálogo: R396D) y 0.2 µl de la enzima de restricción. El volumen final de la reacción fue de 20 µl. Se realizó el mismo procedimiento con la enzima RSAI (Promega, N° de catálogo: R6371).

Para ambas enzimas la reacción de restricción se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C y se inactivó la enzima por calentamiento 15 minutos a 72°C. Los productos de restricción fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Conda Pronadisa, N° de catálogo: 8100.10), teñido con bromuro de etidio (SIGMA N° de catálogo: E7637-1G), bajo las siguientes condiciones: 120V durante 80 minutos con buffer TAE (TAE buffer 1X Invitrogen, N° de catálogo: 24710-030) y marcador de peso molecular de ADN de 1 kb (Thermo scientific, N° de catálogo: 5M0311).

Los patrones de restricción generados se analizaron de acuerdo con el número de bandas y tamaño respecto al marcador de peso molecular utilizado. Para el análisis de agrupamiento se incluyeron los perfiles que presentaron al menos 2 bandas. Se definió como “ribotipo” a aquel grupo de cepas con perfiles de restricción enzimática idénticos.

La selección de cepas para identificación genética se realizó tomando en cuenta los ribotipos establecidos. A partir de los ribotipos con más de 50 cepas, se eligieron e identificaron el 10% de ellas y para los ribotipos formados con menos de 50 cepas, se eligieron e identificaron entre el 50% y el 20% de ellas. Para aquellos ribotipos formados por cepas únicas, se identificó el 100% de las mismas.

6.6.9. Secuenciación e identificación bacteriana

Con el ADN de cada cepa elegida se realizó una segunda amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR, siguiendo la metodología ya descrita. Los productos de esta amplificación fueron purificados con el kit Amicon Ultra filter® (Millipore, N° de cat. UFC500308) siguiendo las instrucciones del fabricante y enviados al servicio de secuenciación de Macrogen USA (Macrogen Sequenciation Service, Maryland, USA).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y corregidas con los programas: ChromasPro versión 2.6.4 y BioEdit versión 5.0.9. Se construyeron secuencias consenso, las cuales fueron comparadas con secuencias depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), así como en la base de datos pública EzTaxon.

6.7. Análisis de datos.

- Captura de datos en el paquete computacional Stata versión 21.
- Análisis descriptivo de la población estudiada: características sociodemográficas, características clínicas, antecedentes gineco-obstétricos, y características propias de la enfermedad.
- Análisis de diferencia de medias y de diferencia de proporciones para datos sociodemográficos, clínicos, gineco-obstétricos y de la enfermedad.
- Regresión logística binaria para el análisis de factores de riesgo para la adquisición de cáncer cervicouterino.
- Análisis descriptivo y comparativo de las especies bacterianas identificadas en ambos grupos de estudio.

6.8. Aspecto ético

La presente investigación cumplió con los lineamientos de la declaración de Helsinki y del reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud, ya que, de acuerdo con lo establecido en el Título segundo, capítulo 1, artículo 13, toda investigación en la que el ser humano sea objeto de estudio deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos.

Tanto el protocolo de investigación como los consentimientos informados y el cuestionario aplicado, fueron aprobados por los comités de investigación y ética del Instituto Nacional de Cancerología de México, con clave 016/011/ICI y CEI/1016 respectivamente (Anexos 4 y 5). Toda la información obtenida fue manejada con absoluta confidencialidad.

7. RESULTADOS.

7.1 Capítulo de libro aceptado

7.1.1. Título del capítulo de libro enviado y aceptado

Características sociodemográficas y clínicas de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado y mujeres sin la enfermedad

7.1.2. Página frontal del manuscrito

**Características sociodemográficas y clínicas de mujeres con cáncer
cervicouterino localmente avanzado y mujeres sin la enfermedad**

Gauddy Lizeth Manzanares-Leal¹, Jaime Coronel-Martinez², Miguel Rodriguez-Morales³, Lilia Patricia Bustamante-Montes⁴, Horacio Sandoval-Trujillo⁵, Ninfa Ramírez-Durán^{6*}

¹ Maestra en Ciencias Odontológicas, Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México, México. ORCID: 000-0002-4517-2661

² Médico Oncólogo con Alta Especialidad en Medicina Genómica, División de Investigación clínica, Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Delegación Tlalpan, Ciudad de México, México. ORCID: 0000-0002-3048-0813

³ Médico Cirujano, Laboratorio de Genómica, Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Delegación Tlalpan, Ciudad de México, México. ORCID: 0000-0002-4302-1069

⁴ Doctora en Ciencias en Salud Pública con área de concentración en epidemiología, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México. ORCID: 0000-0002-8529-9982

⁵ Doctor en Ciencias, Departamento de Sistemas biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Delegación Coyoacán, Ciudad de México, México.

⁶ Doctora en Ciencias Biológicas, Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México, México. ORCID: 0000-0003-3108-895X

***Autor de correspondencia:** Dra. Ninfa Ramírez-Durán, ninfard@hotmail.com, Tel: 01-722- 2773326

7.1.3. Carta de aceptación del capítulo de libro



La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias de
la Salud a través de la Coordinación de Estudios
Avanzados de la Facultad de Enfermería y Obstetricia

Otorga la presente:

CARTA DE ACEPTACIÓN

A: Gaudy Lizeth Manzanares Leal, Jaime Coronel
Martínez, Miguel Rodríguez Morales, Lilia Patricia
Bustamante Montes, Horacio Sandoval Trujillo,
Ninfa Ramírez Durán

Por haber realizado el Capítulo de Libro "*Características sociodemográficas y clínicas de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado y mujeres sin la enfermedad*" el cual se insertará en la edición del libro "Temas Selectos en Biomedicina en Ciencias de la Salud Vol. II".

ATENTAMENTE

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2018, Año del 190 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"



FACULTAD DE ENFERMERÍA
Y OBSTETRICIA
DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA SALUD

DRA. EN C.S. PATRICIA CRUZ BELLO
COORDINADORA DE ESTUDIOS AVANZADOS

Facultad de Enfermería UAEM,
Paseo Tollocan s/n esq. Jesús Carranza col.
Moderna de la Cruz. C.P. 50180.
Toluca, Estado de México
Tel. (722) 2706270 / 2702357
feyo@uaemex.mx



7.1.4. Resumen

Introducción: En México, el cáncer cervicouterino representa un grave problema de salud ya que las etapas avanzadas son las más frecuentes. Además de la infección por VPH, existen otras características que podrían

influir en su aparición, curación o progreso. **Objetivo:** Determinar las características sociodemográficas y clínicas de mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino localmente avanzado. **Metodología:** Se realizó un estudio descriptivo, comparativo. Como fuentes para la obtención de datos se utilizó un cuestionario avalado por los consejos de ética e investigación del Instituto Nacional de Cancerología, así como las historias clínicas de las pacientes. Se eligieron mujeres pertenecientes a una cohorte de estudio sobre cáncer cervicouterino que se llevó a cabo de febrero de 2016 a febrero de 2018. Se obtuvieron características sociodemográficas y clínicas (gineco-obstétricas, sexuales, hábitos y de la enfermedad). Se obtuvieron diferencias de medias y de proporciones de los datos obtenidos. El análisis estadístico se realizó en el programa stata versión 15. **Resultados:** Hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar las características presentes en ambos grupos de estudio. **Conclusiones:** La mayoría de las mujeres pertenecientes al grupo con cáncer cervicouterino presentaron características reportadas como factores de riesgo para la adquisición de la enfermedad. Estos resultados pueden ser útiles para formular estrategias dirigidas a controlar las características de alto riesgo para la adquisición de cáncer cervicouterino que presentan las mujeres mexicanas.

7.1.5. Apartados del capítulo de libro

Introducción

El cáncer cervicouterino (CaCu) se encuentra entre los 10 tipos de cáncer con mayor incidencia, prevalencia y mortalidad a nivel mundial¹. Según lo reportado por la Organización mundial de la Salud (OMS), el cáncer cervicouterino es el cuarto cáncer más frecuente en mujeres en el mundo². En los países desarrollados se han logrado disminuir las tasas de incidencia de esta enfermedad gracias a los programas de tamizaje y de tratamiento³. En países subdesarrollados, el impacto del CaCu es muy alto ya que en ellos se reporta más del 85% de las defunciones por esta patología^{2,3}.

En México, el Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI), mostró que, en el grupo poblacional femenino de 30 a 59 años de edad, el cáncer de órganos genitales femeninos (cérvicouterino y ovario) se ubica como la segunda causa de muerte por neoplasias malignas. Para el año 2016, tres de cada 10 decesos femeninos por cáncer se debieron a esta entidad patológica específica⁴.

La causa principal por la que en México representa un grave problema de salud, es la detección tardía, ya que en la mayoría de los casos se diagnostica en estadios localmente avanzados (IIB-IVA). De acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), a pesar de las campañas de tamizaje, el diagnóstico frecuente en etapas avanzadas ocurre en un alto porcentaje⁵.

A pesar de que actualmente se ha establecido que la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) cumple un papel causal en el cáncer de cuello uterino^{6,7}, aún no se comprenden por completo los factores que pueden determinar si una infección por este virus se resolverá o progresará a lesiones de alto grado y en última instancia a cáncer cervicouterino en sus distintas etapas. Entender las causas de la alta carga de cáncer de cuello uterino es difícil debido a una compleja interacción de muchos factores biológicos, organizativos, económicos y socioculturales, es por ello que la prevención es clave.

En una búsqueda de factores no relacionados con el VPH, este estudio tuvo como objetivo determinar las características sociodemográficas y clínicas de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado y de mujeres sin la enfermedad.

Metodología

Se realizó un estudio transversal, descriptivo, comparativo, a partir de la información recabada de una cohorte de mujeres con cáncer cervicouterino del INCan, sometidas a tratamiento antineoplásico. Se conformaron dos grupos de estudio:

1. Grupo de mujeres con cáncer cervicouterino: este grupo estuvo constituido por pacientes adscritas al Instituto Nacional de Cancerología, que presentaron cáncer cervicouterino localmente avanzado incidente (IB2 a IVA), diagnosticadas mediante citología cervical positiva y confirmado histológicamente (n=68).
2. Grupo de mujeres sin cáncer cervicouterino: este grupo estuvo conformado por acompañantes o familiares de las pacientes con la enfermedad y mujeres asistentes a citas de tamizaje, todas ellas con citología cervical negativa (n=60).

Para ambos grupos, se excluyeron mujeres menores de edad, que estuvieran embarazadas y que no cumplieran con requisitos propios de la toma de muestra del estudio principal (uso de antibióticos, duchas vaginales, relaciones sexuales previas y presencia de menstruación).

A partir de un cuestionario aprobado por los comités de ética e investigación del INCan, con previa firma del consentimiento informado y aplicado por el médico tratante, se obtuvieron las siguientes características sociodemográficas: edad, escolaridad, ocupación, estado civil, lugar de origen y lugar de residencia.

Dentro de las características clínicas se obtuvieron las siguientes:

a) Características gineco-obstétricas y sexuales: menarca, inicio de vida sexual activa, número de parejas sexuales, embarazos, parto vaginal, cesárea, aborto, flujo vaginal anormal, metrorragia, dispareunia, hemorragia postcoital, ciclos menstruales, menopausia y uso de método anticonceptivo.

- b) Características de hábitos: consumo de tabaco y consumo de alcohol.
- c) Características de la enfermedad (recolectadas mediante las historias clínicas): tamaño del tumor, etapa clínica de la enfermedad y tipo histológico del tumor.

Toda la información fue recabada en una hoja de cálculo de Excel y analizada mediante el programa estadístico STATA versión 15 (Statistical Software: Release 15. 2017, College Station, TX). Las variables continuas se informaron como media, desviación estándar, máximo y mínimo. Se aplicó la prueba t de student para el análisis de diferencia de medias. Las variables categóricas se informaron como proporciones y porcentajes. Se aplicaron pruebas de Chi² y prueba exacta de Fisher para diferencia de proporciones. Se tomó un valor de $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo y un índice de confianza del 95%.

Resultados

Características sociodemográficas

La media de edad tanto de las mujeres que padecen cáncer como de las mujeres libres de la enfermedad fue de 45 años, con edades máximas entre 63 y 65 años y edades mínimas entre 25 y 30 años respectivamente. El grupo de mujeres con CaCu tuvo como nivel escolar más frecuente la primaria (39%), mientras que el 46% de las mujeres sin la enfermedad estudiaron hasta la secundaria. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (Tabla I).

Las mujeres con CaCu se dedicaban en su mayoría al hogar (79%) y en una mayor proporción eran solteras (33%). Las mujeres sin CaCu fueron mayormente empleadas fuera de sus casas (60%) y la mayoría eran casadas (55%), diferencias que fueron significativas entre ambos grupos de estudio (Tabla I).

La distribución proporcional por entidad federativa de procedencia mostró que el grupo de mujeres con CaCu provenía en su mayoría del Estado de México (32%) y de la Ciudad de México (22%) y tenían como residencia la misma entidad. El grupo de mujeres libres de la enfermedad procedían en su mayoría de la Ciudad de México (50%) y generalmente tuvieron el mismo lugar de residencia (Tabla I).

Tabla I. Características sociodemográficas de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado y mujeres sin la enfermedad

Variable	Mujeres con cáncer cervicouterino n=68				Mujeres sin cáncer cervicouterino n=60				p
	Media	D.E.	Máx	Mín	Media	D.E.	Máx	Mín	

Edad	45.53	9.460184	68	25	45.08	8.931551	65	30	0.6168*
	Frecuencia		%		Frecuencia		%		
Escolaridad									
Ninguna	12		17.65		3		5.00		0.003**
Primaria	27		39.71		11		18.33		
Secundaria	19		27.94		28		46.67		
Preparatoria	8		11.76		14		23.33		
Licenciatura	2		2.94		3		5.00		
Posgrado	0		0		1		1.67		
Ocupación									
Hogar	54		79.41		36		60		0.016***
Fuera del hogar	14		20.59		24		40		
Estado civil									
Soltera	23		33.82		12		20		0.031**
Unión libre	17		25.00		12		20		
Casada	22		32.35		33		55		
Divorciada	2		2.94		3		5		
Viuda	4		5.88		0		0		
Lugar de origen									
Cd. de México	15		22.06		30		50.00		<0.01**
Estado de México	22		32.35		22		36.67		
Hidalgo	4		5.88		1		1.67		
Oaxaca	3		4.41		2		3.33		
Puebla	7		10.29		1		1.67		
Tlaxcala	4		5.88		0		0		
Veracruz	9		13.24		1		1.67		
Chiapas	3		4.41		0		0		
Morelos	1		1.47		1		1.67		
Guerrero	0		0		2		3.33		
Lugar de residencia									
Cd. de México	20		29.41		34		56.67		0.021**
Estado de México	33		48.53		21		35.00		
Hidalgo	2		2.94		1		1.67		
Oaxaca	0		0		0		0		
Puebla	2		2.94		1		1.67		
Tlaxcala	1		1.47		0		0		
Veracruz	7		10.29		1		1.67		
Chiapas	1		1.47		0		0		
Morelos	2		2.94		1		1.67		
Guerrero	0		0		1		1.67		

D.E: Desviación Estándar. Máx.: Máximo. Min.: Mínimo

p≤0.05 *Prueba t para diferencia de medias. **Prueba exacta de Fisher para diferencia de proporciones

***Prueba de χ^2 para diferencia de proporciones.

Características clínicas

a) Características gineco-obstétricas y sexuales

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la menarca, el número de parejas sexuales, aborto, dispareunia, ciclos menstruales ni menopausia (Tabla II).

El grupo de mujeres con cáncer cervicouterino presentó un inicio de vida sexual activa por debajo de los 18 años. El grupo de mujeres libres de enfermedad tuvo inicio de vida sexual activa posterior a los 19 años, esta diferencia fue estadísticamente significativa (Tabla II).

Las mujeres con cáncer cervicouterino tuvieron en promedio 3 embarazos, la mayoría con partos por vía vaginal y las mujeres sin cáncer tuvieron 2 embarazos y una mayor cantidad de cesáreas. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla II).

Una alta proporción de mujeres con cáncer cervicouterino presentó flujo vaginal anormal (76%), metrorragia (83%) y hemorragia postcoital (42%). Al ser comparados estos resultados, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto al resultado observado en mujeres sin cáncer (Tabla II).

Para ambos grupos de estudio, se observó que la mayoría no utilizaban métodos anticonceptivos (51% mujeres con CaCu, 46% mujeres sin CaCu). Se encontraron diferencias en cuanto a las mujeres que sí utilizaban algún método anticonceptivo. Las mujeres con CaCu utilizaron en su mayoría (20%) métodos anticonceptivos hormonales, mientras que las mujeres libres de la enfermedad usaban mayoritariamente métodos anticonceptivos de barrera (25%). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla II).

Tabla II. Características clínicas de mujeres con cáncer cérvicouterino localmente avanzado y mujeres sin la enfermedad

Variable	Características gineco-obstétricas y sexuales								P
	Media	D.E.	Máx	Mín	Media	D.E.	Máx	Mín	
Menarca	12.64	1.37	16	9	12.36	1.63	7	16	0.294*
Inicio de vida sexual activa	17.5	3.03	29	12	19.95	3.17	30	15	<0.01*
Número de parejas sexuales	2.20	1.11	5	1	2.25	1.45	8	1	0.846*

Embarazos	3.64	2.04	11	0	2.25	1.31	7	0	<0.01*
Parto vaginal	2.89	2.17	11	0	1.43	1.39	6	0	<0.01*
Cesárea	0.38	0.79	3	0	0.71	0.86	3	0	0.024*
Aborto	0.30	0.67	3	0	0.23	0.76	4	0	0.554*
	Frecuencia		%		Frecuencia		%		P
Flujo vaginal anormal									
	Si	52	76.47		6	10.00			<0.01***
	No	16	23.53		54	90.00			
Metrorragia									
	Si	57	83.82		0	0			<0.01***
	No	11	16.18		60	100			
Dispareunia									
	Si	12	17.65		18	30			0.100***
	No	56	82.35		42	70			
Hemorragia postcoital									
	Si	29	42.65		4	6.67			<0.01***
	No	39	57.35		56	93.33			
Ciclos menstruales									
	Regulares	54	79.41		44	73.33			0.418***
	Irregulares	14	20.59		16	26.67			
Menopausia									
	Si	30	44.12		20	33.33			0.212***
	No	38	55.88		40	66.67			
Uso de método anticonceptivo									
No usa		35	51.47		28	46.67			0.045**
De barrera (preservativo)		7	10.29		15	25.00			
Hormonal oral		14	20.59		5	8.33			
Dispositivo intrauterino		9	13.24		5	8.33			
Obliteración tubárica		3	4.41		7	11.67			
Hábitos									
Tabaquismo									
	Si	14	20.59		15	25.00			0.552***
	No	54	79.41		45	75.00			
Alcoholismo									
	Si	9	13.24		21	35.00			0.004***
	No	59	86.76		39	65.00			

D.E: Desviación Estándar. Máx.: Máximo. Min.: Mínimo

p≤0.05 *: Prueba t para diferencia de medias. ** Prueba exacta de Fisher para diferencia de proporciones

***Prueba de χ^2 para diferencia de proporciones.

b) Características de hábitos

El hábito de consumir tabaco fue más frecuente en mujeres sin cáncer cervicouterino, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por otro lado, se encontró que hay más mujeres que beben alcohol (35%) en el grupo sin enfermedad respecto al grupo con cáncer cervicouterino (13%), resultado estadísticamente significativo (Tabla II).

c) Características de la enfermedad

La media del tamaño del tumor encontrado en las mujeres con CaCu fue de 5cms, el estadio más frecuente fue el IIB (51%) y el tipo histológico más frecuente fue carcinoma epidermoide al presentarse en el 89.71% de los casos (Tabla III).

Tabla III. Características clínicas de mujeres con cáncer cérvicouterino localmente avanzado				
Características de la enfermedad				
Variable	Media	D.E.	Máx	Mín
Tamaño del tumor (cms)	5.11	1.33	10	2
		Frecuencia	Porcentaje	
Etapa clínica de la enfermedad				
	IB2	11	16.18	
	IIA	5	7.35	
	IIB	35	51.47	
	IIIA	3	4.41	
	IIIB	9	13.24	
	IVA	5	7.35	
Tipo histológico del tumor				
	Carcinoma epidermoide	61	89.71	
	Adenocarcinoma	7	10.29	

Discusion

Este estudio proporciona información importante sobre las características sociodemográficas y clínicas que pueden diferenciar a las mujeres con cáncer cérvicouterino localmente avanzado respecto a mujeres representativas de la población sin enfermedad en México.

El grupo de mujeres con cáncer cervicouterino se caracterizó por tener una edad promedio de 45 años, la escolaridad más frecuente fue la primaria, cuyo bajo nivel está reportado como un factor de riesgo para este padecimiento⁸⁻¹⁰. Se dedicaban a labores del hogar, lo que puede influir, de acuerdo con estudios previos, con un menor alcance monetario que podría impactar en el acceso a la detección oportuna de la enfermedad o al tratamiento⁸⁻¹⁰.

Eran solteras en su mayoría, coincidiendo con reportes anteriores acerca de que existe un mayor riesgo de padecer neoplasia intraepitelial cervical en mujeres sin pareja fija¹¹. El lugar de origen y de residencia de la mayoría fue el centro del país, aunque no sabemos a ciencia cierta si pertenecían o vivían en un medio rural o urbano, lo que podría ayudar a evaluar si esta característica podría tomarse en cuenta para analizarla como un posible factor de riesgo de acuerdo con lo que sugieren estudios previos^{12,13}.

El perfil clínico de este grupo de estudio se puede describir como mujeres con una media de menarca de 12 años, lo cual coincide con el grupo sin enfermedad no considerándose un posible factor de riesgo. Sin embargo, el inicio de vida sexual activa a temprana edad, menor a los 18 años, que se diferencia del grupo sin cáncer, si está reportado frecuentemente como un factor de riesgo para la adquisición de CaCu¹⁴⁻¹⁵. Este hecho puede explicarse al tomar en cuenta que la zona de transformación del epitelio cervical es más proliferativa a temprana edad (adolescencia y pubertad), por lo que es susceptible a alteraciones producidas por la infección por VPH¹⁶.

Este grupo tuvo un bajo número de parejas sexuales. Un alto número de embarazos, con mayor frecuencia de partos por vía vaginal, estas características están reportadas como factores de riesgo. El aumento de los niveles de estrógeno y progesterona durante el embarazo son probablemente responsables de las alteraciones en la zona de transformación, induciendo una respuesta inmune reducida a la infección por VPH e influenciando el riesgo de persistencia o progresión¹⁷⁻¹⁹

A este grupo pertenecieron mujeres que en su mayoría presentaron flujo vaginal anormal, metrorragia y hemorragia postcoital, estas características pueden ser hallazgos relevantes en mujeres en las que se sospeche que tienen alto riesgo de padecer la enfermedad²⁰. Con ciclos menstruales regulares, menos de la mitad de ellas habían comenzado la menopausia y generalmente no utilizaban métodos anticonceptivos. Sin datos de alto consumo de tabaco o alcohol. Tanto el consumo de métodos anticonceptivos hormonales como de alcohol y tabaco son considerados factores de riesgo reportados por la literatura, en este estudio no se encontraron datos que coincidieran con ello, posiblemente porque sólo se evaluó la utilización o no de ellos, sin determinar el tiempo de uso o la cantidad.

Respecto a la enfermedad, las mujeres de este grupo presentaban carcinoma de tipo epidermoide, con un tamaño de tumor de entre 2 y 10cms, la mayoría diagnosticadas en la etapa clínica IIB en la que la enfermedad se ha propagado a los tejidos adyacentes al cuello uterino (el parametrio) pero no se ha propagado a sitios distantes, resultados coincidentes con reportes anteriores.

Por otro lado, el grupo de mujeres sin enfermedad fue una población con edad media de 45 años, un nivel educativo superior al grupo con CaCu, ya que prevalecieron los estudios de secundaria y preparatoria, con una representante a nivel posgrado. La mayoría de estas mujeres trabajaban fuera del hogar lo que puede representar un ingreso económico más alto que el percibido por el grupo de mujeres con CaCu. La mayoría estaban casadas, procedentes y residentes en un medio urbano, lo que puede aumentar la posibilidad de un mayor acceso a servicios de salud especializados. Reportes previos describen estas características (mayor

ingreso económico, residencia urbana y mayor nivel educativo) como posibles factores protectores para la adquisición de la enfermedad.⁸⁻¹⁰.

Clínicamente fueron mujeres con menarca a los 12 años de edad, con un inicio de vida sexual activa reportada como de menor riesgo²⁰, posterior a los 18 años, un bajo número de parejas sexuales, bajo número de embarazos y generalmente sus partos fueron por vía vaginal, sin embargo, hay un alto porcentaje de estas mujeres que fueron sometidas a cesárea. Todas estas características difieren considerablemente del grupo con enfermedad.

Fueron mujeres con baja incidencia de flujo vaginal anormal, nula metrorragia y baja presencia de hemorragia postcoital, además refirieron tener dispareunia. Sus ciclos menstruales fueron regulares y menos de una tercera parte de ellas estaban en la menopausia. La mayoría no utilizaba métodos anticonceptivos, con bajo consumo de tabaco y de alcohol, aunque este último fue mayor que en el grupo con CaCu.

Conclusiones

Podemos concluir que existen diferencias entre ambos grupos en las características analizadas. Las mujeres incluidas en este estudio que padecían cáncer cervicouterino localmente avanzado presentaron más características consideradas como factores de riesgo para la adquisición de cáncer cervicouterino. El grupo sin la enfermedad presentó características asociadas a factores protectores o de menor riesgo para la adquisición de cáncer cervicouterino. Estos resultados pueden ser útiles para formular estrategias dirigidas a modificar o prevenir las características de alto riesgo que presentan las mujeres mexicanas para evitar la adquisición de cáncer cervicouterino o lograr su detección oportuna.

Referencias

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA oncology*. 2015;1(4):505–27. doi: [10.1001/jamaoncol.2015.0735](https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.0735)
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Papilomavirus humanos (PVH) y cáncer cervicouterino. Nota descriptiva [Revista en Internet] Marzo de 2015 [Acceso 13 de abril de 2018] N°380, disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/es/>
3. World Health Organization, Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice 2nd ed; 2014 ISBN 978-92-4-154895-3
4. Instituto Nacional de Geografía e Informática, Estadísticas a propósito del Día mundial contra el cáncer (4 de febrero) Datos nacionales. Comunicado de prensa [suplemento en Internet] 2018, [Acceso 13 de abril de 2018] 61/18:1-13 disponible en http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf

5. Montalvo GE, Coronel-Martínez JA, Alvarado-Zermeño A., Cantú de León DF, Flores-Alatraste D, Ortega-Rojo A, González-Enciso A, Isla-Ortíz D, Muñoz-González DE, Robles-Flores JU, Solorza-Luna G, Mota-García A, Gallardo-Rincón D, Morales-Vázquez F, Lucely-Cetina M, Herrera-Gómez A. Oncogüía, *Cancerología* [Revista en Internet] 2011 [Acceso 13 de abril de 2018] 6,61 – 69, disponible en <http://incan-mexico.org/revistainvestiga/elementos/documentosPortada/1327324533.pdf>
6. Xu HH, Wang K, Feng XJ, Dong SS, Lin A, Zheng LZ, Yan WH. Prevalence of human papillomavirus genotypes and relative risk of cervical cancer in China: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2018 Jan 11;9(20):15386-15397. doi: 10.18632/oncotarget.24169. eCollection 2018 Mar 16.
7. Wong JPH, Vahabi M, Miholjic J, Tan V, Owino M, Li ATW, Poon MKL Knowledge of HPV/cervical cancer and acceptability of HPV self-sampling among women living with HIV: A scoping review. *Curr Oncol*. 2018 Feb;25(1):e73-e82. doi: 10.3747/co.25.3855. Epub 2018 Feb 28. Review.
8. Temkin SM, Rimel BJ, Bruegl AS, Gunderson CC, Beavis AL, Doll KM. A contemporary framework of health equity applied to gynecologic cancer care: A Society of Gynecologic Oncology evidenced-based review. *Gynecol Oncol*. 2018 Apr;149(1):70-77. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.11.013. Review.
9. L.S. Downs, J.S. Smith, I. Scarinci, L. Flowers, G. Parham, The disparity of cervical cancer in diverse populations, *Gynecol. Oncol*. 2008, 109 S22–S30.
10. J. Barnholtz-Sloan, N. Patel, D. Rollison, K. Kortepeter, J. MacKinnon, A. Giuliano, Incidence trends of invasive cervical cancer in the United States by combined race and ethnicity, *Cancer Causes Control* 2009 20 1129–1138
11. Muwonge R, Ngo Mbus L, Ngoma T, Gombe Mbalawa C, Dolo A, da Ganda Manuel M, Nouhou H, Nacoulma M, Mwaiselage J, Koulibaly M, Bayo S, Nsonde Malanda J, De Vuyst H, Herrero R, Sankaranarayanan R, Keita N; IARC Multicentre Study Group on Cervical Cancer Early Detection Socio-demographic and reproductive determinants of cervical neoplasia in seven sub-Saharan African countries *Cancer Causes Control*. 2016 Dec;27(12):1437-1446. Epub 2016 Nov 7.
12. Zahnd W, Fogleman AJ, Jenkins WD Rural-Urban Disparities in Stage of Diagnosis Among Cancers with Preventive Opportunities. *Am J Prev Med*. 2018 Mar 14. pii: S0749-3797(18)30053-9. doi: 10.1016/j.amepre.2018.01.021.
13. Moy E, Garcia MC, Bastian B, et al, Leading causes of death in nonmetropolitan and metropolitan Areas—United States, 1999–2014. *MMWR Surveill Summ*. 2017;66:1–8 DOI: <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6601a1>
14. Ferrera A, Velema JP, Figueroa M, Bulnes R, Toro LA, Claros JM et al Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int J Epidemiol*, 2000 29(5):817–825
15. Franceschi S, Rajkumar T, Vaccarella S, Gajalakshmi V, Sharmila A, Snijders PJ et al Human papillomavirus and risk factors for cervical cancer in Chennai, India: a case-control study. *Int J Cancer* 2003,107(1):127–133
16. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, et al (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? Th international perspective. *Int J Cancer*, 111, 278-85.
17. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS et al Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359(9312):1093–1101
18. Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK (2013) Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer* 108(1):234–239
19. Sethi S, Muller M, Schneider A, Blettner M, Smith E, Turek L et al (1998) Serologic response to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 178(2):360–364
20. Lazcano-ponce EC, Rojas-Martínez R, López-Acuña MP, López-Carrillo L, Hernández-Ávila, Factores de riesgo reproductivo y cáncer cérvico-uterino en la Ciudad de México. *Salud Pública de México*

[Revista en Internet] 1993 [Acceso 1 de abril de 2018] 35(1):65-73, ISSN 1606-7916. Disponible en: <<http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5633/6126>>.

7.2. Primer artículo enviado

7.2.1. Título del primer artículo enviado

Identification of cervico-vaginal microbiota in women with locally advanced cervical uterine cancer

7.2.2. Carta de envío del primer artículo

De: em.jmm.0.5a614b.1ea931b6@editorialmanager.com
<em.jmm.0.5a614b.1ea931b6@editorialmanager.com> en nombre de JMM
<em@editorialmanager.com>
Enviado: viernes, 6 de abril de 2018 03:37 p. m.
Para: Ninfa Ramírez-Durán
Asunto: Submission Confirmation for Journal of Medical Microbiology article JMM-D-18-00257 - [EMID:198b05b1390d1713]
CC: glml20@hotmail.com, quiechc8@hotmail.com, leugimroselarom@gmail.com, jessica9salazar@hotmail.com, patricia.bustamante@edu.uag.mx, hsandov@hotmail.com

Ms. No. JMM-D-18-00257
Identification of cervico-vaginal microbiota in women with locally advanced cervical uterine cancer
Gaudy Lizeth Manzanares-Leal; Jaime Coronel-Martínez; Miguel Rodríguez-Morales; Jessica Elizabeth Salazar-Campos; Lilia Patricia Bustamante-Montes; Horacio Sandoval-Trujillo; Ninfa Ramírez-Durán

Dear Dr. Ramírez-Durán,

Your submission entitled "Identification of cervico-vaginal microbiota in women with locally advanced cervical uterine cancer" has been received by Journal of Medical Microbiology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://jmm.editorialmanager.com/>.

Your manuscript reference number is JMM-D-18-00257. Please use this in all correspondence relating to this manuscript.

Thank you for submitting your work to Journal of Medical Microbiology.

Yours sincerely,

Journal of Medical Microbiology

IMPORTANT INFORMATION:

Please note that we cannot publish the accepted version of the manuscript without a completed Licence to Publish form. In addition, for papers reporting new sequence data, papers will not be published online until the sequence data are released in public databases.

Please make sure you check the details you have entered into the Editorial Manager site very carefully, particularly the manuscript title, subject category and author details, as these will be used when your accepted PDF is published online.

7.3. Segundo artículo enviado

7.3.1. Título del segundo artículo enviado

Changes in cervicovaginal microbiota of women with cervical cancer during antineoplastic treatment

7.3.2. Carta de envío del segundo artículo

De: em.igc.0.5f4185.a3217a3c@editorialmanager.com
<em.igc.0.5f4185.a3217a3c@editorialmanager.com> en nombre de International Journal of Gynecological Cancer <em@editorialmanager.com>

Enviado: miércoles, 14 de noviembre de 2018 01:23 p. m.

Para: Ninfa Ramírez-Durán

Asunto: IJGC Submission Confirmation

11/14/2018

Dear Dr. Ramírez-Durán,

Thank you for your submission to the International Journal of Gynecological Cancer. Your submission entitled "Changes in cervicovaginal microbiota of women with cervical cancer during antineoplastic treatment" has been received by the editorial office. If you have any questions during the lifecycle of your manuscript, please do not hesitate to contact me by email at ijgc@jeditorial.com.

What happens next?

- Your manuscript will be reviewed to ensure that it meets the technical requirements as explained in the [Instructions for Authors](#). We will contact you shortly if your manuscript requires changes prior to review.
- Your manuscript will then be assigned to an Editor and given a manuscript number, at which point you will receive a notification via email.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author at <https://igc.editorialmanager.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind Regards,

International Journal of Gynecological Cancer

In compliance with data protection regulations, please contact the publication office if you would like to have your personal information removed from the database.

8. RESULTADOS ADICIONALES

8.1. Patrones de restricción de las especies bacterianas identificadas en todas las etapas de muestreo

Los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) son marcadores moleculares que muestran diferencias en las secuencias de ADN homólogas, detectadas por

la presencia de fragmentos de diferentes longitudes al ser digeridas por enzimas de restricción específicas. Debido a que el aislamiento de ADN suficiente para el análisis de RFLP requiere mucho tiempo, a la técnica se le adiciona la amplificación de fragmentos específicos de ADN mediante PCR. En este estudio se amplificó el gen 16S rRNA. Con ello se generaron patrones de restricción o ribotipos que correspondieron a cada una de las especies bacterianas identificadas, esto permitió tipificar las cepas en grupos bien establecidos. Los ribotipos resultantes para cada una de las especies identificadas a lo largo de todo el proyecto de investigación se muestran en las figuras 1 - 6.

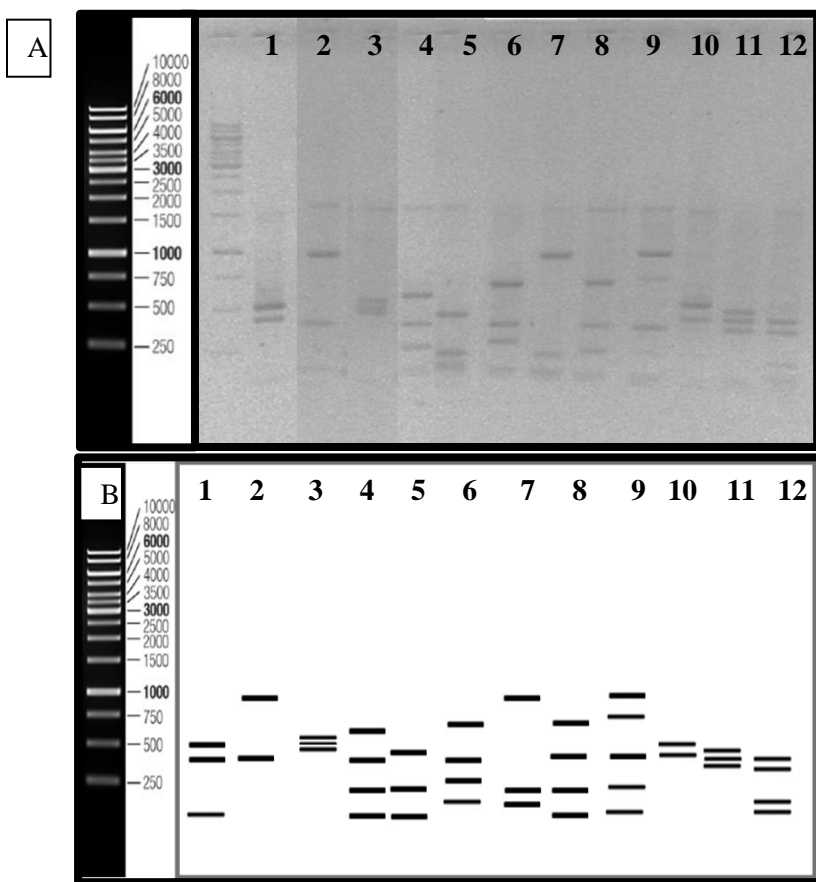


Figura 1. Ribotipos obtenidos mediante RFLP de 16S rRNA.

Enzima RSAI.

A: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

B: Diagrama de los patrones de restricción observados en la figura A.

1. *Staphylococcus epidermidis*
2. *Enterococcus faecalis*
3. *Escherichia coli*
4. *Corynebacterium amycolatum*
5. *Corynebacterium jeikeium*
6. *Streptococcus agalactiae*
7. *Streptococcus urinalis*
8. *Escherichia fergusonii*
9. *Lactobacillus rhamnosus*
10. *Bacillus safensis*
11. *Bacillus malikii*
12. *Corynebacterium striatum*.

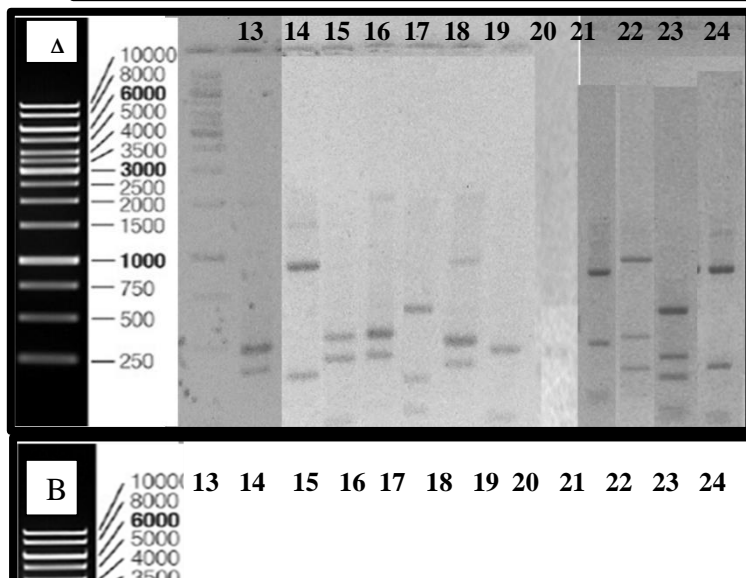


Figura 2. Ribotipos obtenidos mediante RFLP de 16S rRNA. **Enzima RSAI.**

A: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

B: Diagrama de los patrones de restricción observados en la figura A.

13. *Staphylococcus auricularis*
14. *Facklamia hominis*
15. *Paenibacillus urinalis*
16. *Staphylococcus pasteurii*
17. *Pseudocitrobacter faecalis*
18. *Staphylococcus capitis*
19. *Brevibacterium*

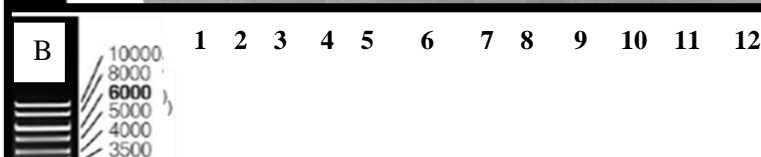
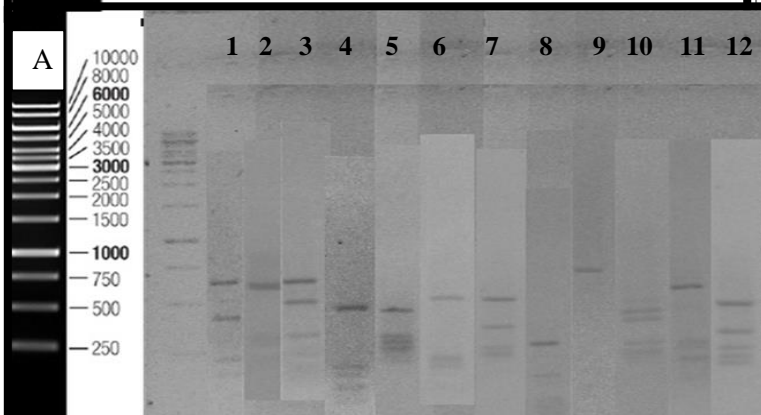
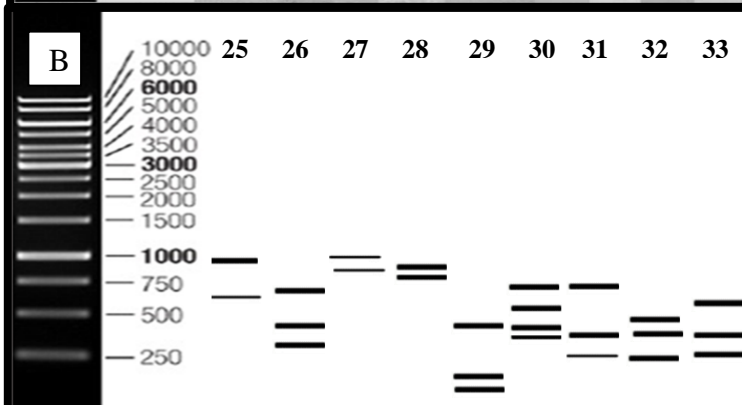
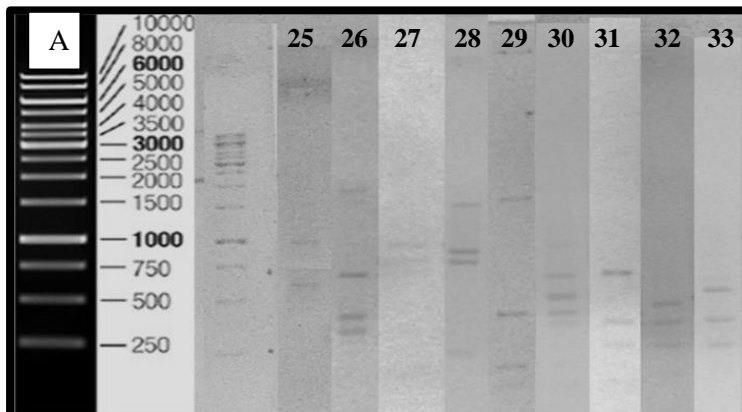


Figura 3. Ribotipos obtenidos mediante RFLP de 16S rRNA. **Enzima MSPI**

A: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

B: Diagrama de los patrones de restricción observados en la figura A.

25. *Corynebacterium lipophiloflavum*

26. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

27. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

28. *Oligella urethralis*

29. *Streptococcus oralis*

30. *Corynebacterium coyleae*

31. *Streptococcus mitis*

32. *Micrococcus luteus*

33. *Corynebacterium lactis*.

Figura 4. Ribotipos obtenidos mediante RFLP de 16S rRNA.

Enzima MSPI.

A: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

B: Diagrama de los patrones de restricción observados en la figura A.

1. *Staphylococcus epidermidis*

2. *Enterococcus faecalis*

3. *Escherichia coli*

4. *Corynebacterium amycolatum*

5. *Corynebacterium jeikeium*

6. *Streptococcus agalactiae*

7. *Streptococcus urinalis*

8. *Escherichia ferusonii*

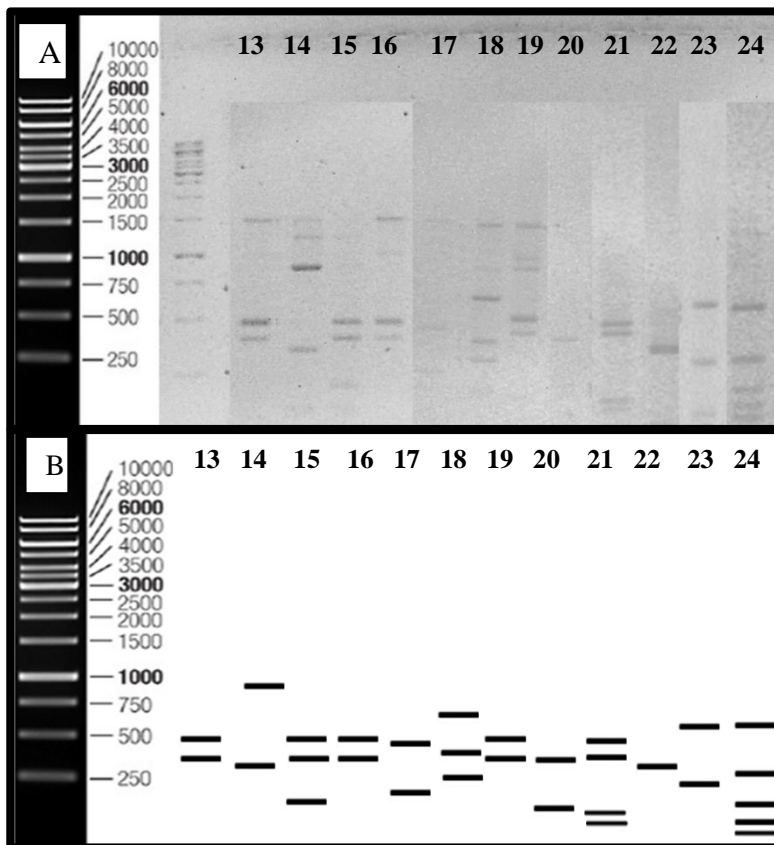


Figura 5. Ribotipos obtenidos mediante RFLP de 16S rRNA.

Enzima MSPI.

A: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

B: Diagrama de los patrones de restricción observados en la figura A.

13. *Staphylococcus auricularis*

14. *Facklamia hominis*

15. *Paenibacillus urinalis*

16. *Staphylococcus pasteurii*

17. *Pseudocitrobacter faecalis*

18. *Staphylococcus capitis*

19. *Brevibacterium massiliense*

20. *Klebsiella oxytoca*

21. *Enterococcus durans*

22. *Streptococcus anginosus*

23. *Streptococcus pneumoniae*

24. *Streptococcus pasteurianus*.

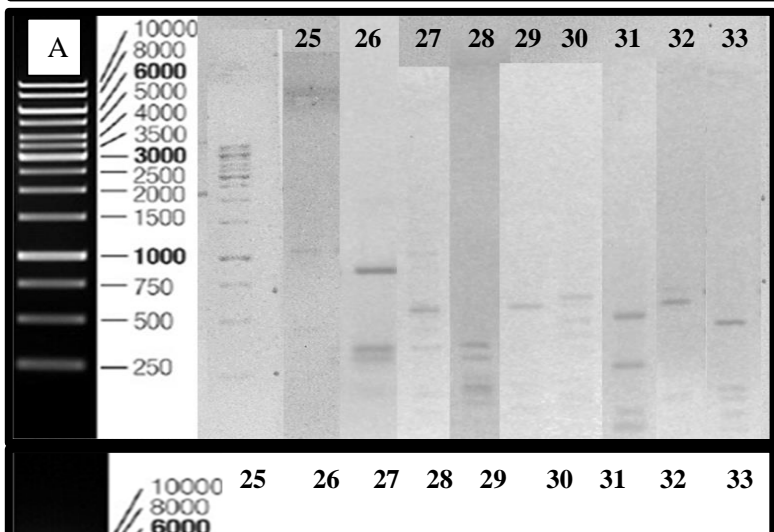


Figura 6. Ribotipos obtenidos mediante RFLP de 16S rRNA.

Enzima MSPI

A: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

B: Diagrama de los patrones de restricción observados en la figura A.

25. *Corynebacterium lipophiloflavum* 55

26. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

27. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

28. *Oligella urethralis*

9. DISCUSION GENERAL

El cáncer cervicouterino, es un problema de salud pública especialmente en países subdesarrollados. A nivel mundial genera altas tasas de mortalidad y una fuerte carga económica para los sistemas de salud^{61, 83}. El estudio de los factores que pueden prevenir o que pueden considerarse de riesgo para el establecimiento y desarrollo de la enfermedad son primordiales para mejorar los índices de incidencia y prevalencia de este padecimiento.

En el presente estudio, se detectaron varios factores de riesgo para la adquisición de cáncer cervicouterino, reportados anteriormente. Uno de ellos fue el nivel socioeconómico evaluado de manera aproximada al medir la ocupación y la escolaridad. En este rubro, el grupo expuesto tuvo niveles más bajos de escolaridad y dedicación exclusiva al hogar de manera más frecuente que el grupo no expuesto, lo que podría indicar un nivel socioeconómico más bajo y por ende, representar un factor de riesgo⁵³. Los presentes datos pueden proporcionar información para evaluar la mejora de la promoción del cribado a mujeres que se encuentren dentro de este conjunto ocupacional y de escolaridad, y con ello promover la detección temprana de la enfermedad.

Por otro lado, de acuerdo con los datos ginecobstétricos y sexuales obtenidos, se encontró que, el grupo expuesto inició su vida sexual activa a menor edad y tuvieron un mayor número de embarazos y partos respecto al grupo no expuesto. Diversos estudios son coincidentes con este resultado estableciendo que la presencia de estas variables puede ser un factor de riesgo ya que se relacionan con la infección temprana por VPH, con cambios hormonales y con modificaciones epiteliales provocadas por el trauma cervical repetido durante los múltiples embarazos y partos⁹³⁻⁹⁷.

El número de parejas sexuales, el uso de métodos anticonceptivos hormonales, el hábito tabáquico y el consumo de alcohol, no se identificaron como factores de riesgo en este estudio, a diferencia de lo reportado en estudios previos⁹⁸⁻¹⁰².

En cuanto a la composición de la microbiota bacteriana de cérvix, de las mujeres sin cáncer cervicouterino, esta se caracterizó por la presencia de bacterias intestinales (*Enterococcus*) y de especies poco reportadas por la literatura y que no se observaron en el grupo de mujeres con cáncer cervicouterino: *Facklamia hominis*¹⁰³, *Paenibacillus urinalis*¹⁰⁴, *Pseudocitrobacter faecalis*¹⁰⁵ y *Brevibacterium masiliense*¹⁰⁶.

La presencia de estas bacterias puede deberse al papel que juegan los hábitos higiénicos, culturales y sexuales tanto de las mujeres incluidas en el estudio como de sus parejas y que pueden modificarse al tener una patología como el cáncer. Estos resultados arrojan el primer reporte de la presencia de estas especies bacterianas en el medio ambiente cervicovaginal de mujeres mexicanas sin patología cervical.

De forma general, es posible establecer que la comunidad bacteriana de cérvix del grupo no expuesto coincide con reportes previos^{33, 107} que manifiestan que entre el 20% y el 40% de las mujeres sanas y asintomáticas presentan comunidades vaginales no dominadas por *Lactobacillus* que incluyen una amplia gama de bacterias anaerobias facultativas. En ausencia de sintomatología, esta comunidad bacteriana puede considerarse "normal" y "sana", aunque su composición se asemeje a la asociada con vaginosis bacteriana sintomática¹⁰⁸.

Por otro lado, las mujeres con cáncer cervicouterino previo al tratamiento antineoplásico mostraron una alta presencia de flujo vaginal anormal (mal olor y coloración atípica) al momento del diagnóstico, que mejoró a través del tratamiento antineoplásico y no se presentó al finalizar la terapéutica. Esta sintomatología puede indicar la presencia de disbiosis cervicovaginal asociada al establecimiento del cáncer. Previamente se ha documentado que las mujeres con disbiosis vaginal tienen un alto riesgo de desarrollar cambios preneoplásicos cervicales y de contraer el virus oncogénico del papiloma humano⁷⁵⁻⁷⁸.

En este grupo de estudio, la microbiota presente en la medición basal se caracterizó por ser más abundante que la aislada en el grupo no expuesto e incluso durante y después de los

tratamientos antineoplásicos. Se trató de una comunidad bacteriana dominada por *Staphylococcus epidermidis*, bacteria considerada parte de la microbiota comensal cervicovaginal, pero que puede presentarse como un patógeno emergente especialmente en pacientes inmunodeprimidos ya que puede llegar a inducir perfiles de respuesta inflamatoria similares a los observados en mujeres con vaginosis bacteriana^{109, 110}. Sin embargo, a pesar de que esta especie fue aislada en altas cantidades en la medición basal del grupo de mujeres con cáncer cervicouterino, también fue encontrada con alta predominancia en el grupo de mujeres sin cáncer cervicouterino, así como durante y después de los tratamientos antineoplásicos, encontrándose incluso cuando ya no hubo sintomatología relacionada con procesos infecciosos cervicovaginales, por lo que no podemos asumir que esté involucrada en la sintomatología reportada.

Lo más notable en este grupo de estudio fue la dominancia de distintas especies de *Corynebacterium*. Se ha reportado la presencia de este género bacteriano como microbiota comensal vaginal³³, sin embargo, también se ha asociado con endocarditis, bacteriemia, sepsis, infecciones de heridas, de tracto urinario y de vías respiratorias. Su potencial patógeno puede deberse a la producción de biopelículas y a su frecuente resistencia a los antibióticos¹¹¹⁻¹¹³.

Se puede observar que, en el grupo no expuesto, así como durante los tratamientos antineoplásicos y de manera posterior al periodo de vigilancia, la abundancia de *Corynebacterium* disminuyó considerablemente coincidiendo con la desaparición de la sintomatología relacionada con flujo cervicovaginal anormal. Es probable que la asociación entre la sintomatología y este género bacteriano se deba a un desequilibrio provocado por cambios en el medio ambiente cervicovaginal al establecerse el cáncer y que promovió la proliferación de estas especies.

Podemos considerar que la abundante presencia de *Corynebacterium* en mujeres con cáncer cervicouterino, sin tratamiento antineoplásico, puede ser la causante de la sintomatología coincidente con aquella presente en procesos de vaginitis aerobia^{114, 115} y que los tratamientos antineoplásicos actúan ya sea disminuyendo su diversidad y abundancia de

manera directa o de manera indirecta cambiando el medio ambiente cervicovaginal a uno menos apto para su proliferación. Este es el primer reporte, a la fecha, acerca de la alta prevalencia del género *Corynebacterium* en cérvix de mujeres mexicanas con cáncer cervicouterino localmente avanzado. Sus implicaciones en la salud o en la enfermedad cervicovaginal en mujeres con este padecimiento deberán ser estudiadas más a fondo.

En resumen, se puede comparar la microbiota de cérvix de de mujeres con CaCu localmente avanzado, con aquella descrita por Donders y col. en 2002¹¹⁴, refiriéndose a la vaginitis aerobia. Este reporte es de suma importancia ya que, las comunidades bacterianas similares a las presentes en dicha patología pueden estar implicadas en la progresión a neoplasia intraepitelial cervical y cáncer en mujeres con VPH de alto riesgo positivo. Esto puede ser debido a sus características inflamatorias que podrían influir en la respuesta inmune o de acuerdo con Monif y col. 1999, a que los estreptococos del grupo B inhiben el crecimiento de lactobacilos¹¹⁶.

Por otro lado, en la evaluación de las etapas relacionadas con la aplicación de los tratamientos antineoplásicos, podemos observar que, de manera posterior a los tratamientos tanto de quimioterapia y radioterapia como de braquiterapia, la microbiota de cérvix estuvo dominada por los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus*.

Al respecto, algunas especies de *Enterococcus* se han asociado con enfermedades urinarias y se ha visto que tiene una alta afinidad por incorporarse a biofilms producidos por *Gardnerella vaginalis*¹¹⁷, sin embargo, estudios previos reportan el hallazgo de *Enterococcus* como microbiota bacteriana frecuente del tracto vaginal de mujeres sanas en edad fértil, por encima de los aislados de *Lactobacillus*. Se ha documentado que su presencia se relaciona con la salud del ecosistema cervicovaginal ya que son bacterias productoras de ácido láctico que pueden sustituir el papel que juegan los lactobacilos en este medio ambiente, además, presentan buena capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y tienen un buen potencial para usarse como probióticos¹¹⁸⁻¹²¹.

La mayor abundancia de *Enterococcus* se obtuvo cuando las pacientes ya se habían sometido a los tratamientos antineoplásicos y ya no presentaban sintomatología asociada a vaginosis aerobia. Son necesarios más estudios para comprender si la mejora de los síntomas y el establecimiento de esta microbiota se debe a un cambio en el medio ambiente cervicovaginal producido por los tratamientos y que representa un estado de recuperación o si este tipo de género bacteriano es menos susceptible al efecto de los tratamientos y por eso prevalece y prolifera.

Por último, la medición post-vigilancia se caracterizó por mostrar una alta presencia de los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. La presencia tanto de *Staphylococcus* como de *Enterococcus* coincide con lo observado en mujeres sin cáncer cervicouterino por lo que podemos considerar esta microbiota como comensal.

Se puede observar que, a diferencia de las etapas anteriores, en esta medición proliferaron diversas especies de *Streptococcus*, representando el 40% de las especies bacterianas aisladas en este punto. No hay presencia de sintomatología relacionada con procesos bacterianos patológicos a nivel cervicovaginal y está documentado que la mayoría de estas especies están comúnmente presentes como parte de la microbiota normal del tracto genital femenino de mujeres sanas¹²²⁻¹²⁴.

Por lo tanto, las mujeres que terminaron el periodo de vigilancia post tratamiento antineoplásico, presentaron una microbiota bacteriana de cérvix que podría considerarse normal o no patógena. En esta etapa se documenta un aumento en la diversidad de especies bacterianas, respecto a las etapas relacionadas con el tratamiento e incluso comparada con la medición basal de las mujeres sin cáncer cervicouterino, aunque con menos abundancia. Este hallazgo podría significar un restablecimiento del ecosistema cervicovaginal con condiciones más aptas para el desarrollo de una microbiota cervicovaginal equilibrada.

10. CONCLUSIONES GENERALES

1. La microbiota bacteriana de cérvix de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado sin tratamiento antineoplásico fue la más abundante. Ésta disminuyó con los tratamientos antineoplásicos y posteriormente alcanzó números similares a los encontrados en las mujeres sin cáncer cervicouterino.
2. La composición de la microbiota bacteriana de cérvix de mujeres mexicanas sin cáncer cervicouterino mostró alta presencia de *Enterococcus* y *Staphylococcus*, poca presencia de *Corynebacterium* y bacterias poco comunes: *Facklamia hominis*, *Paenibacillus urinalis*, *Pseudocitrobacter faecalis* y *Brevibacterium masiliense*. Sin presencia de sintomatología asociada a patología infecciosa cervicovaginal, esta se puede considerar como una microbiota normal.
3. La microbiota bacteriana de cérvix de mujeres mexicanas con cáncer cervicouterino localmente avanzado, de reciente diagnóstico, se caracterizó por presentar *Staphylococcus* y la predominancia de diversas especies de *Corynebacterium*, cuya presencia puede ser la causante de la sintomatología coincidente con vaginitis aerobia en estas pacientes.
4. La microbiota bacteriana de cérvix de mujeres mexicanas con cáncer cervicouterino localmente avanzado posterior a los tratamientos con quimioterapia y radioterapia, así como, una vez finalizado el tratamiento con braquiterapia se caracterizó por presentar una considerable disminución de las diversas especies de *Corynebacterium* y aumento en la presencia de *Enterococcus faecalis* coincidiendo con la ausencia de sintomatología relacionada con patología infecciosa cervicovaginal representando un posible estado de recuperación del equilibrio bacteriano cervicovaginal.

5. La microbiota bacteriana de cérvix de mujeres mexicanas con cáncer cervicouterino localmente avanzado al finalizar el periodo post-vigilancia se caracterizó por mostrar una alta presencia de los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. En este período se documentó un aumento en la diversidad de especies bacterianas, respecto a las etapas relacionadas con el tratamiento e incluso comparada con la medición basal, aunque con menos abundancia. Este hallazgo podría significar un restablecimiento del ecosistema cervicovaginal con condiciones más aptas para el desarrollo de una microbiota cervicovaginal sana.

6. Es posible concluir que la composición de la microbiota de cérvix presente en mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado presenta diferencias al ser comparada con la microbiota de cérvix presente en mujeres sin este padecimiento y que dicha microbiota cambia durante las diferentes etapas del tratamiento antineoplásico.

11. BIBLIOHEMEROGRAFÍA UTILIZADA

1. Margulis L, Sagan D. *Microcosmos: Four Billion Years of Evolution from our Microbial Ancestors*. New York: Summit Books; 1986.
2. Inoue Y, Shimojo N, Microbiome/microbiota and allergies. *Semin Immunopathol* 2015;37(1):57-64
3. Hong J, Kim J, Quan LH, Heu S, Roh E. Purification and Characterization of Pasteuricin Produced by *Staphylococcus pasteurii* RSP-1 and Active against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Food Prot*. 2018 Oct 3:1768-1775. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-111.
4. Zhong L, Zhang X, Covasa M. Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 28;20(24):7878-86. doi: 10.3748/wjg.v20.i24.7878.
5. Mohajeri MH, Brummer RJM, Rastall RA, Weersma RK, Harmsen HJM, Faas M, Eggersdorfer. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *M. Eur J Nutr*. 2018 May 10. doi: 10.1007/s00394-018-1703-4.
6. Llop HA, Váldez-Dapena VMM, Suazo SJL, *microbiología y parasitología médicas*. La Habana, Editorial de ciencias medicas, 2001;1:107-122.
7. Lederberg J, McCray AT, *Ome Sweet Omics a genealogical treasury of words*. *Scientist* 2001;15:8.
8. Kim Y, Koh I, Rho M, Deciphering the human microbiome using next-generation sequencing data and bioinformatics approaches. *Methods* 2015;79-80:52-59
9. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*. 2011;474(7351): 327– 36.
10. Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard MR, Hamaker BR, Kaur A, et al. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol*. 2011;65(3): 190–5.

11. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simo´n-Soro A, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J*. 2011;85.
12. NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19(12): 2317–23
13. Polymenakou PN, Christakis CA, Mandalakis M, Oulas A. Pyrosequencing analysis of microbial communities reveals dominant cosmopolitan phylotypes in deep-sea sediments of the eastern Mediterranean Sea. *Res Microbiol*. 2015; 923-2508(15)00057.
14. Costello EK, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009;326:1694–1697.
15. Proctor LM. The National Institutes of Health Human Microbiome Project. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016 Dec;21(6):368-372. doi: 10.1016/j.siny.2016.05.002.
16. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J* 2012 6:1176-1185.
17. Vicariotto F, Mogna L, Del Piano M. Effectiveness of the two microorganisms *Lactobacillus fermentum* LF15 and *Lactobacillus plantarum* LP01, formulated in slow-release vaginal tablets, in women affected by bacterial vaginosis: a pilot study. *J Clin Gastroenterol*. 2014 Nov-Dec;48 Suppl 1
18. Bukharin OV, Sgibnev AV. [Effect of metabolites of H₂O₂-producing lactobacilli on functional activity of lysozyme]. [Article in Russian]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2013 Jul-Aug;(4):60-4.
19. Marrazzo JM. Biomedical prevention of HIV in women: challenges and approaches, with particular reference to the vaginal microbiome. *Trans am clin climatol assoc*. 2018;129:63-73.
20. Molenaar MC, Singer M, Ouburg S. The two-sided role of the vaginal microbiome in *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* pathogenesis *J Reprod Immunol*. 2018 Aug 22;130:11-17. doi: 10.1016/j.jri.2018.08.006
21. Gottschick C, Deng ZL, Vital M, Masur C, Abels C, Pieper DH, Wagner-Döbler I. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial

- vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. 2017 Aug 14;5(1):99. doi: 10.1186/s40168-017-0305-3.
22. Aroutcheva AA, Simoes JA, Faro S. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001;9(1):33–39.
 23. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(2):300–310.
 24. Kroon SJ, Ravel J, Huston WM. Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertil Steril*. 2018 Aug;110(3):327-336. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.036.
 25. Döderlein A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. *Zentbl Bakteriol Microbiol Hyg Abt* 1892;11: 699.
 26. Thomas S. Doderlein's Bacillus: *Lactobacillus Acidophilus*. *J Infect Dis* 1928;43:218–227.
 27. Reid GMacklaim JM, Gloor GB, Anukam KC, Cribby S, Reid G. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* *Natl Acad Sci* 2011;108(suppl 1): 4688–4695.
 28. Tarnberg M, Jakobsson T, Jonasson J, Forsum U. Identification of randomly selected colonies of lactobacilli from normal vaginal fluid by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions. *APMIS* 2002;110(11):802-810
 29. Stoyancheva G1, Marzotto M, Dellaglio F, Torriani S. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Arch Microbiol*. 2014;196(9):645-53.
 30. Madhivanan P, Raphael E, Rumphs A, Krupp K, Ravi K, Srinivas V, Arun A, Reingold AL, Klausner JD, Riley LW6. Characterization of culturable vaginal *Lactobacillus* species among women with and without bacterial vaginosis from the United States and India: a cross-sectional study. *J Med Microbiol*. 2014 Jul;63(Pt 7):931-5
 31. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology* 2004;150(Pt 8):2565–2573.

32. Yamamoto HS, Delaney ML, Onderdonk AB & Doncel GF. Novel vaginal microflora colonization model providing new insight into microbicide mechanism of action. *MBio* 2012; 2:168–11
33. Ravel J, Gajer P, Abdo Z et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *P Natl Acad Sci* 2011;108: 4680–4687
34. Al Kassaa I, Hamze M, Hober D, Chihib NE, Drider D, Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon. *Microb Ecol.* 2014 Apr;67(3):722-34
35. Gajer P, Brotman RM, Bai G et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012;4: 132-52
36. Wang KD, Su JR Quantification of *Atopobium vaginae* loads may be a new method for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Clin Lab.* 2014;60(9):1501-8.
37. Gustafsson RJ, Ahrné S, Jeppsson B, Benoni C, Olsson C, Stjernquist M, Ohlsson B. The *Lactobacillus* flora in vagina and rectum of fertile and postmenopausal healthy Swedish women. *BMC Womens Health.* 2011 May 25;11(1):17.
38. Smith BC, Thomas McAndrew, Zigui Chen, Ariana Harari, Adam J. Ratner, The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization *PLoS One.* 2012; 7 (7): e40425.
39. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS One* 2010;5(4):e10197.
40. Workowski KA, Berman SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR Recomm Rep* 2006;55(RR-11):1–94.
41. Mastromarino P, Di Pietro M, Schiavoni G, Nardis C, Gentile M, Sessa R. Effects of vaginal lactobacilli in *Chlamydia trachomatis* infection. *Int J Med Microbiol.* 2014 Jul;304(5-6):654-61.
42. Zozaya-Hinchliffe M, Martin DH, Ferris MJ. Prevalence and abundance of uncultivated *Megasphaera*-like bacteria in the human vaginal environment. *Appl Environ Microbiol* 2010;74(5):1656–1659.

43. Ling ZX, Liu X, Chen XY, Zhu HB, Nelson KE, Xia YX, Li LJ, Xiang CL. Diversity of cervicovaginal microbiota associated with female lower genital tract infections. *Microb Ecol* 2011;61:704–714
44. Yeoman CJ, Thomas SM, Miller ME, Ulanov AV, Torralba M, Lucas S, Gillis M, Cregger M, Gomez A, Ho M, Leigh SR, Stumpf R, Creedon DJ, Smith MA, Weisbaum JS, Nelson KE, Wilson BA, White BA. A multi-omic systems-based approach reveals metabolic markers of bacterial vaginosis and insight into the disease. *PLoS One*. 2013;8(2):e56111
45. Shiozaki A, Yoneda S, Yoneda N, Yonezawa R, Matsubayashi T, Seo G, Saito S. Intestinal microbiota is different in women with preterm birth: results from terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *PLoS One*. 2014 Nov 5;9(11)
46. Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study *BMC Infect Dis*. 2013 Jun 10;13:271.
47. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a metaanalysis. *Br J Cancer* 2003; 88:63-73
48. Guo M, Khanna A, Wang J, Dawlett MA, Kologinczak TL, Lyons GR, Bassett RL Jr, Sneige N, Gong Y, Bevers TB. Three-year risk of high-grade CIN for women aged 30 years or older who undergo baseline Pap cytology and HPV co-screening. *Cancer Cytopathol*. 2017 Aug;125(8):644-651. doi: 10.1002/cncy.21877.
49. FT Cutts, S Franceschi, S Goldie, X Castellsague, S de Sanjose, G Garnett, WJ Edmunds, P Claeys, KL Goldenthal, DM Harper, L Markowitz, Boletín de la OMS, papillomavirus humano y vacunas anti VPH. Revisión. 2012 Disponible en: <http://www.who.int/bulletin/volumes/85/9/06-038414-ab>
50. Documento de posición de la OMS, Vacunas contra el virus del papiloma humano, 2009, 84, 117–132 Disponible en: <http://www.who.int/wer>
51. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-527.

52. Van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 2012; 98: 590-595.
53. Keller MJ, Burk RD, Xie X, Anastos K, Massad S, et al. Risk of Cervical Precancer and Cancer Among HIV-Infected Women With Normal Cervical Cytology and No Evidence of Oncogenic HPV Infection. *JAMA* 2012;308: 362–369.
54. Guo Ming, Lulin Hu, Mithra Baliga , Zhi Él ., Hughson MD, The Predictive Value of p16INK4a and Hybrid Capture 2 Human Papillomavirus Testing for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia, *American Journal of Clinical Pathology*, 2004;122, 894-901
55. Dols AM, Reid G, Joelle MB, Tempelman H, Romke BT, Wim GV, Boon ME. HPV Type Distribution and Cervical Cytology among HIV-Positive Tanzanian and South African Women, *Obstet Gynecol.* 2012; 2012: 514146. doi: 10.5402/2012/514146
56. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, Broeck DV: Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2011, 11:10.
57. De la Garza-Salazar JG, Morales-Vásquez F, Meneses-García A. *Cervical Cancer*. Springer International Publishing Switzerland 2017, ISBN 978-3-319-45230-2 ISBN 978-3-319-45231-9 (eBook). DOI 10.1007/978-3-319-45231-9
58. Secretaría de Salud, SEDENA, SEMAR, Guía de práctica clínica, diagnóstico y tratamiento del cáncer Cervicouterino, evidencias y recomendaciones. *Catalogo Maestro de Guías de Práctica Clínica:IMSS-33309*, CENETEC 2010. Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/>
59. IARC Working Group on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. *Human Papillomavirus. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, Vol 64 of IARC World Health Organization, 1995.
60. Barnholtz-Sloan, N. Patel, D. Rollison, K. Kortepeter, J. MacKinnon, A. Giuliano, Incidence trends of invasive cervical cancer in the United States by combined race and ethnicity, *Cancer Causes Control* 2009 20 1129–1138

61. FIGO COMMITTEE ON GYNECOLOGIC ONCOLOGY. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2009; 105:103-104
62. Montalvo EG, Coronel Martínez JA, Alvarado ZA, Cantú LD, Flores AD, Ortega RA, González EA, Isla OD, y col. ONCOGUIA. *Cancerología* 6 (2011): 61 – 69
63. Nasiell K y cols: Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 665-9.
64. Primer consenso nacional de prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2014;13(Suppl 4):1–3.
65. Landoni F, Maneo A, Colombo A, Placa F, Milani R, Perego P, Favini G, Ferri L, Mangioni C. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet*. 1997;350:535–40. doi:10.1016/S0140-6736(97)02250-2.
66. Peters 3rd WA, Liu PY, Barrett 2nd RJ, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, Souhami L, Grigsby P, Gordon Jr W, Alberts DS. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol*. 2000;18(8):1606–13.
67. Fu KK. Biological basis for the interaction of chemotherapeutic agents and radiation therapy. *Cancer*. 1985;55(9 Suppl):2123–30.
68. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM *Pharmacol*. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Rev*. 2012 Jul; 64(3):706-21
69. Lorusso D, Petrelli F, Coiu A, Raspagliesi F, Barni S. A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2014 Apr; 133(1):117-23.
70. Lertsanguansinchai P, Lertbutsayanukul C, Shotelersuk K, Khorprasert C, Rojpornpradit P, Chottetanaprasith T, Srisuthep A, Suriyapee S, Jumpangern C, Tresukosol D, Charoonsantikul C. Phase III Randomized trial comparing LDR and HDR brachytherapy in treatment of cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59 (5)1424–1431. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.01.034

71. Halperin EC, Pérez C. Endometrial cáncer. In: Pérez and Brady's principles and practice of radiation oncology. 6th ed. Copyright 2013. p. 1426–48.
72. Viswanathan AN, Beriwal S, De Los Santos JF, Demanes DJ, Gaffney D, Hansen J, Jones E, Kirisits C, Thomadsen B, Erickson B, American Brachytherapy Society. American Brachytherapy Society consensus guidelines for locally advanced carcinoma of the cervix. Part II: High-dose-rate brachytherapy. *Brachytherapy*. 2012;11(1):47–52. doi:10.1016/j.brachy.2011.07.002.
73. Mead PB Cervical-vaginal flora of women with invasive cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 1978 Nov;52(5):601-4.
74. Thadepalli H, Savage EW, Rao B Anaerobic bacteria associated with cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*. 1982 Dec;14(3):307-1
75. Oh HY, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Prk SY y col. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin Microbiol Infec* 2015;i.ei-i.e9.
76. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, Bhatia R, Lyons D, Paraskevaidis E, Li JV, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep*. 2015;5:16865. doi: 10.1038/srep16865
77. Piyathilake CJ, Ollberding NJ, Kumar R, Macaluso M, Alvarez RD, Morrow CD. Cervical microbiota associated with risk of higher grade cervical intraepithelial neoplasia in women infected with high-risk human papillomaviruses. *Cancer Prev Res (Phila)* 2016;9(5):357–66. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0350
78. Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K, Bahena-Roman M, Tellez-Sosa J, Martinez-Barnetche J, Cortina-Ceballos B, Lopez-Estrada G, Delgado-Romero K, Burguete-Garcia AI, Cantu D, et al. Cervical microbiome and cytokine profile at various stages of cervical cancer: a pilot study. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153274. doi: 10.1371/journal.pone.0153274
79. Blythe JG, Cervical bacterial flora in patients with gynecologic malignancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;15;131(4):438-45.

80. Gerstner GJ, Kucera H, Weghaupt K, Rotter M Endometrial bacteriology in patients with endometrial cancer before and after primary intracavitary irradiation using IR-192 and an afterloading technique. *Arch Gynecol.* 1982;231(4):299-306.
81. Choo YC, Seto WH, Ma HK Cervical-vaginal bacterial flora in patients with cervical carcinoma treated with irradiation and febrile morbidity during intracavitary radium therapy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1984;24(1):34-8.
82. Gilstrap LC, Gibbs RS, Michel TJ, Hauth JC Genital aerobic bacterial flora of women receiving radiotherapy for gynecologic malignancy. *Gynecol Oncol.* 1986;23(1):35-9.
83. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Lyon, France: IARC; 2013 Dec Available from: <http://globocan.iarc.fr/>.
84. Dueñas-Gonzalez A1, Cetina L, Mariscal I, de la Garza J.Format. Modern management of locally advanced cervical carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2003 Oct;29(5):389-99.
85. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61, 69-9.
86. Instituto Nacional de Geografía e Informática, Estadísticas a propósito del Día mundial contra el cáncer (4 de febrero) Datos nacionales. Comunicado de prensa [suplemento en Internet] 2018, [Acceso 13 de abril de 2018] 61/18:1-13 disponible en <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018>
87. World Health Organization, Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice 2nd ed; 2014 ISBN 978-92-4-154895-3
88. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal, A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2014;64,9-29.
89. Zondervan KT, Carpenter LM, Painter R, Vessey M.P. Oral contraceptives and cervical cancer further findings from the Oxford Family Planning Association contraceptive study. *Br J Cancer.* 1996;73,1291–1297.
90. La Vecchia C, Boccia S. Oral contraceptives, human papillomavirus and cervical cáncer. *Eur J Cancer Prev.* 2014;23:110–112
91. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002;89, 191–199.

92. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *J Cancer*.2014;135, 453-66.
93. Ferrera A, Velema JP, Figueroa M, Bulnes R, Toro LA, Claros JM et al Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int J Epidemiol*, 2000 29(5):817–825.
94. Franceschi S, Rajkumar T, Vaccarella S, Gajalakshmi V, Sharmila A, Snijders PJ et al Human papillomavirus and risk factors for cervical cancer in Chennai, India: a case-control study. *Int J Cancer* 2003,107(1):127–133
95. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, et al (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? Th international perspective. *Int J Cancer*, 111, 278-85.
96. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS et al Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359(9312):1093–1101
97. Sethi S, Muller M, Schneider A, Blettner M, Smith E, Turek L et al (1998) Serologic response to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 178(2):360–364
98. Hildesheim A1, Brinton LA, Mallin K, Lehman HF, Stolley P, Savitz DA, Levine R. Barrier and spermicidal contraceptive methods and risk of invasive cervical cancer. *Epidemiology*. 1990 Jul;1(4):266-72.
99. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Apr; 18(4):1060-9.
100. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006;119(5):1108e2

101. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, Bosch FX, de Sanjosé S, Dillner J, Gram IT, Tjønneland A, Munk C, Pala V, Palli D, Khaw KT, Barnabas RV, Overvad K, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *J Cancer*. 2014 Jul 15;135(2):453-66. doi: 10.1002/ijc.28666.
102. Roura E, Travier N, Waterboer T, et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. Burk RD, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0147029. doi:10.1371/journal.pone.0147029.
103. LaClaire L, Facklam R. Antimicrobial Susceptibilities and Clinical Sources of *Facklamia* Species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2130–2132.
104. Roux V, Fenner L, Raoult D. *Paenibacillus provencensis* sp. nov., isolated from human cerebrospinal fluid, and *Paenibacillus urinalis* sp. nov., isolated from human urine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58, 682 - 7.
105. Kämpfer, P., Glaeser, S.P., Raza, M.W., Abbasi, S.A., Perry, J.D. *Pseudocitrobacter* gen. nov., a novel genus of the Enterobacteriaceae with two new species *Pseudocitrobacter faecalis* sp. nov., and *Pseudocitrobacter anthropi* sp. nov, isolated from fecal samples from hospitalized patients in Pakistan. *Syst Appl Microbiol*. 2014;37,17-22.
106. Vecten M, Gouriet F, Cano A, Raoult D. *Brevibacterium massiliense* bacteremia. *IDCases*. 2017;7,25-26.
107. Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66,371-89.
108. King CC, Jamieson DJ, Wiener J, et al. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2011;2011:319460
109. Rose PG. Chemoradiotherapy for cervical cancer. *European Journal of Cancer* 2002;38:270-8.
110. Hetsa BA, Kumar A, Ateba CN, Characterization of multiple antibiotic resistant clinical strains of *Staphylococcus* isolated from pregnant women vagina. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018;63(5):607-617. doi: 10.1007/s12223-018-0593-4.

111. Yoon S, Kim H, Lee Y, Kim S Korean Bacteremia caused by *Corynebacterium amycolatum* with a novel mutation in *gyrA* gene that confers high-level quinolone resistance. *J Lab Med.* 2011;31(1):47-8. doi: 10.3343/kjlm.2011.31.1.47.
112. Chen FL, Hsueh PR, Teng SO, Ou TY, Lee WS. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with central venous catheter infection. *J Microbiol Immunol Infect.* 2012;45(3):255-8. doi: 10.1016/j.jmii.2011.09.016.
113. Yanai M, Ogasawara M, Hayashi Y, Suzuki K, Takahashi H, Satomura A Retrospective evaluation of the clinical characteristics associated with *Corynebacterium* species bacteremia. *Braz J Infect Dis.* 2018;22(1):24-29. doi: 10.1016/j.bjid.2017.12.002.
114. Donders G, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG,* 2002;109, 34–43
115. Fan A, Yue Y, Geng N, Zhang H, Wang Y, et al. Aerobic vaginitis and mixed infections: comparison of clinical and laboratory findings. *Arch Gynecol Obstet.* 2013;287, 329-35
116. Monif GRG. Semiquantitative bacterial observations with group B streptococci. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999;7: 227–229.
117. Castro MS, Molina MA, Azpiroz MB, Díaz AM, Ponzio R, Sparo MD, Manghi MA, Canellada AM. Probiotic activity of *Enterococcus faecalis* CECT7121: effects on mucosal immunity and intestinal epithelial cells. *J Appl Microbiol.* 2016;121(4):1117-29. doi: 10.1111/jam.13226.
118. Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol.* 2011; 2;151(2):125-40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014.
119. Xu S, Liu T, Radji CA, Yang J, Chen L. Isolation, Identification, and Evaluation of New Lactic Acid Bacteria Strains with Both Cellular Antioxidant and Bile Salt Hydrolase Activities In Vitro. *J Food Prot.* 2016;79(11):1919-1928. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-096.
120. Nami Y, Abdullah N, Haghshenas B, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Probiotic assessment of *Enterococcus durans* 6HL and *Lactococcus lactis* 2HL isolated from

- vaginal microflora. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 8):1044-51. doi: 10.1099/jmm.0.074161-0.
121. Nami Y, Abdullah N, Haghshenas B, Radiah D, Rosli R, Yari Khosroushahi A. A newly isolated probiotic *Enterococcus faecalis* strain from vagina microbiota enhances apoptosis of human cancer cells. *J Appl Microbiol.* 2014;117(2):498-508. doi: 10.1111/jam.12531.
122. Edwards MS, Rench MA, Palazzi DL, Baker CJ. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in healthy elderly persons. *Clin Infect Dis.* 2005;1;40(3):352-7.
123. Landwehr-Kenzel S, Henneke P. Interaction of *Streptococcus agalactiae* and Cellular Innate Immunity in Colonization and Disease. *Front Immunol.* 2014; 29;5:519. doi: 10.3389/fimmu.2014.00519. eCollection 2014.
124. Numanović F, Smajlović J, Gegić M, Delibegović Z, Bektaš S, Halilović E, Nurkić J. Presence and resistance of *Streptococcus agalactiae* in vaginal specimens of pregnant and adult non-pregnant women and association with other aerobic bacteria. *Med Glas (Zenica).* 2017;1;14(1):98-105. doi: 10.17392/876-16.

12. ANEXOS

ANEXO 1: Consentimiento informado para mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado incluidas en el estudio.



**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
CONSENTIMIENTO INFORMADO Y ACEPTACION
DE PARTICIPACION**



1. Datos generales

Investigador principal.

Nombre: Jaime Alberto Coronel Martínez

Teléfono: 56280400

Correo electrónico: quiehc8@hotmail.com

Título del proyecto: **ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN MUJERES CON CÁNCER CERVICOUTERINO ATENDIDAS EN EL INCAN Y EN MUJERES SANAS.**

Versión del consentimiento: 2015

Sitio donde se realizará: Instituto Nacional de Cancerología.

2. Participación voluntaria

Su médico le ha diagnosticado cáncer cervico-uterino, por lo que le estamos invitando a participar en una investigación para evaluar la microbiota vaginal mediante la obtención de una muestra de exudado vaginal. Para este estudio se espera que participen 50 personas con diagnóstico similar a usted. SU PARTICIPACION ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA Y USTED PUEDE ABANDONAR EL ESTUDIO EN EL MOMENTO QUE LO DESEE SIN AFECTAR SU ATENCIÓN MEDICA NI CUALQUIERA DE LOS DERECHOS QUE USTED TIENE COMO PACIENTE EN EL CASO DE QUE USTED NO DESEE PARTICIPAR O DESEE ABANDONAR EL ESTUDIO.

3. Información para el paciente sobre la justificación y objetivos del procedimiento

Le invitamos a que participe en un estudio de investigación, para evaluar, si pacientes con el tipo de cáncer que usted tiene pudieran tener una microbiota vaginal diferente a las mujeres sanas. SU PARTICIPACION ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA Y NO AFECTARA SU ATENCION MEDICA.

4. Datos propios del procedimiento

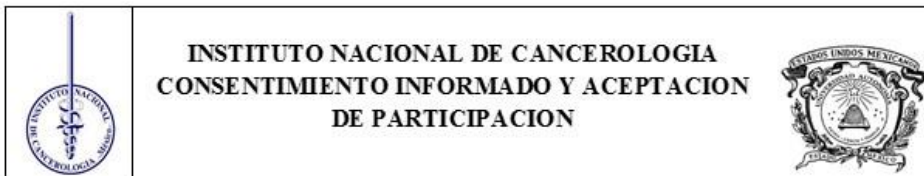
Si usted acepta participar y una vez que firme el consentimiento y se confirme que pueda participar en el estudio, antes de iniciar el tratamiento, se le tomará una muestra de exudado vaginal. Una vez realizada esta prueba, usted recibirá su tratamiento. Usted será valorado por un médico cada semana. En la consulta se le tomara una muestra de exudado vaginal al inicio de su tratamiento, a la mitad y al final del mismo. La toma de muestra de exudado vaginal es segura, para realizarla se le colocara en posición ginecológica, con la ayuda de un especulo se expondrá su cuello vaginal para que mediante un isopo especial sea tomada una muestra del exudado vaginal. El tiempo de realización de la toma de muestra es de 10-15 minutos.

5. Beneficios

Si usted acepta participar no obtendrá un beneficio directo de los resultados de este estudio. La información obtenida en este estudio podría ayudarnos en el futuro a mejorar el control de su enfermedad para otros pacientes.

6. Riesgos

Es esperable que usted tenga las molestias propias de la toma de muestra: dolor local y probable sangrado.



7. Procedimientos Alternativos

Su participación en este estudio es completamente voluntaria, si decide no participar en el estudio será tratado de forma convencional.

8. Responsabilidad del paciente

Al aceptar participar en este estudio usted se compromete a asistir a sus consultas en las fechas que se le indiquen, y si usted se muda o no regresa al Instituto, se le podrá llamar o buscar y averiguar cómo se encuentra de salud. Así mismo se compromete a aceptar la realización de algunas preguntas sobre usted y sus hábitos, y la realización de pruebas incluyendo la toma de muestra de exudado vaginal.

9. Confidencialidad

Sólo su doctor y sus colaboradores sabrán que usted está participando en el estudio. Los registros que se hagan se harán identificándolo sólo con un código y no con el nombre; sin embargo personal autorizado podrá revisar su expediente clínico como parte de su actividad de supervisión del estudio. Si los resultados de este estudio son publicados, usted no será identificado por el nombre.

10. Compensación

Usted no recibirá remuneración alguna por su participación. Usted entiende que su participación en el estudio es voluntaria.

11. Terminación del estudio

En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento a participar en el estudio, sin que su tratamiento médico posterior se vea afectado. Su médico también podrá detener el estudio por razones médicas u otras razones.

12. Personas a contactar

EN CASO DE DUDAS SOBRE SU PARTICIPACION EN ESTE ESTUDIO, PODRA CONTACTAR AL INVESTIGADOR PRINCIPAL, Dr. Jaime Alberto Coronel Martinez, al tel: 562800400 Ext. EN CASO DE DUDAS SOBRE SUS DERECHOS COMO PACIENTE QUE PARTICIPA EN UN ESTUDIO CLINICO, CONTACTAR AL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ETICA: Dra. Myma Candelaria Hernández, al teléfono 56280400,Ext:338.

13. Firmas:

Yo _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, por lo que acepto participar en el estudio: " Estudio comparativo presente en mujeres con cáncer cervicouterino atendidas en el INCAN y en mujeres sanas". Así mismo, he recibido una copia de este consentimiento informado.



**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
CONSENTIMIENTO INFORMADO Y ACEPTACION
DE PARTICIPACION**



NOMBRE DEL PARTICIPANTE _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

NOMBRE DEL TESTIGO 1 _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

Parentesco con el paciente _____

NOMBRE DEL TESTIGO 2 _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

Parentesco con el paciente _____

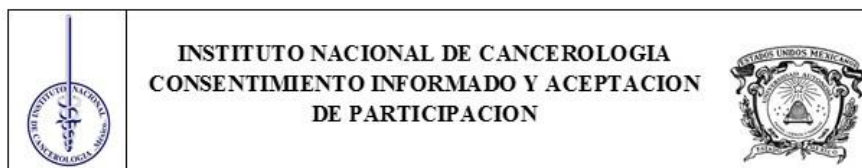
NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN TOMA EL CONSENTIMIENTO

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
AVENIDA SAN FERNANDO 22, CIUDAD DE MÉXICO, CP 14080 TELEFONO 562804

ANEXO 2: Consentimiento informado para mujeres sin cáncer cervicouterino incluidas en el estudio.



1. Datos generales

Investigador principal:

Nombre: Jaime Alberto Coronel Martínez

Teléfono: 56280400 Ext

Correo electrónico: quiehc8@hotmail.com

Título del proyecto: **Estudio del comportamiento de la microbiota presente en cérvix de mujeres asistidas en el Instituto Nacional de Cancerología durante el tratamiento**

Versión del consentimiento: 2015

Sitio donde se realizará: Instituto Nacional de Cancerología.

2. Participación voluntaria

Le estamos invitando a participar en un estudio de investigación para evaluar la microbiota vaginal mediante la obtención de una muestra de exudado vaginal. Para este estudio se espera que participen 50 personas sanas y 50 personas con cáncer cervicouterino. **SU PARTICIPACION ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA Y USTED PUEDE ABANDONAR EL ESTUDIO EN EL MOMENTO QUE LO DESEE SIN AFECTARSE EN EL CASO DE QUE USTED NO DESEE PARTICIPAR O DESEE ABANDONAR EL ESTUDIO.**

3. Información para el paciente sobre la justificación y objetivos del procedimiento

Le invitamos a que participe en un estudio de investigación, para evaluar, si mujeres sanas como usted tiene pudieran tener una microbiota vaginal diferente a las mujeres con cáncer cervicouterino. **SU PARTICIPACION ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA.**

4. Datos propios del procedimiento

Si usted acepta participar y una vez que firme el consentimiento y se confirme que pueda participar en el estudio, se le tomará una muestra de exudado vaginal. Una vez realizada esta prueba, una vez realizada la toma de muestra usted podrá realizar su actividades cotidianas. **La toma de muestra de exudado vaginal es segura, para realizarla se le colocara en posición ginecológica, con la ayuda de un espejo se expondrá su cuello vaginal para que mediante un hisopo especial sea tomada una muestra del exudado vaginal. El tiempo de realización de la toma de muestra es de 10-15 minutos.**

5. Beneficios

Si usted acepta participar no obtendrá un beneficio directo de los resultados de este estudio. La información obtenida en este estudio podría ayudarnos en el futuro a mejorar el control de pacientes con Cáncer Cervicouterino.

6. Riesgos

Es esperable que usted tenga las molestias propias de la toma de muestra: dolor local y probable sangrado.



**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
CONSENTIMIENTO INFORMADO Y ACEPTACION
DE PARTICIPACION**



7. Procedimientos Alternativos

Su participación en este estudio es completamente voluntaria, si decide no participar en el estudio no tendrá ninguna repercusión.

8. Responsabilidad del paciente

Al aceptar participar en este estudio usted se compromete a aceptar la realización de algunas preguntas sobre usted y sus hábitos, y la realización de pruebas incluyendo la toma de muestra de exudado vaginal.

9. Confidencialidad

Sólo su doctor y sus colaboradores sabrán que usted está participando en el estudio. Los registros que se hagan se harán identificándolo sólo con un código y no con el nombre; sin embargo personal autorizado podrán revisar su expediente clínico como parte de su actividad de supervisión del estudio. Si los resultados de este estudio son publicados, usted no será identificado por el nombre.

10. Compensación

Usted no recibirá remuneración alguna por su participación. Usted entiende que su participación en el estudio es voluntaria.

11. Terminación del estudio

En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento a participar en el estudio, sin verse afectada.

12. Personas a contactar

EN CASO DE DUDAS SOBRE SU PARTICIPACION EN ESTE ESTUDIO, PODRA CONTACTAR AL INVESTIGADOR PRINCIPAL, Dr. Jaime Alberto Coronel Martinez, al tel: 562800400 Ext. EN CASO DE DUDAS SOBRE SUS DERECHOS COMO PACIENTE QUE PARTICIPA EN UN ESTUDIO CLINICO, CONTACTAR AL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ETICA: Dra. Myrna Candelaria Hernández, al teléfono 56280400,Ext:338.

13. Firmas

Yo _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, por lo que acepto participar en el estudio: "Estudio comparativo presente en mujeres con cáncer cervicouterino atendidas en el INCAN y en mujeres sanas". Así mismo, he recibido una copia de este consentimiento informado.



**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
CONSENTIMIENTO INFORMADO Y ACEPTACION
DE PARTICIPACION**



NOMBRE DEL PARTICIPANTE _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

NOMBRE DEL TESTIGO 1 _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

Parentesco con el paciente _____

NOMBRE DEL TESTIGO 2 _____

Firma _____

Fecha _____ Teléfono _____

Dirección _____

Parentesco con el paciente _____



NOMBRE Y FIRMA DEL QUIEN TOMA EL CONSENTIMIENTO

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.




NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR

Anexo 3. Cuestionario

	INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA Cuestionario Evaluación de la microbiota vaginal de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado: Estudio piloto.	
---	--	---

Numero de Identificación: _____
Edad: _____, Escolaridad: _____
Ocupación: _____, Estado Civil: _____
Originaria: _____, Residencia actual: _____
Tabaquismo: Si _____, No _____, Frecuencia: _____ años, Estatus actual: _____
Alcoholismo: Si _____, No _____, Frecuencia: _____ años, Estatus actual: _____
Infecciones previas (Máximo 3 meses): _____
Tratamiento utilizado: _____
Dosis: _____, Dias de tratamiento: _____
Flujo vaginal: Si _____, No: _____, Tiempo de aparición: _____
Metrorragia: Si _____, No: _____, Tiempo de aparición: _____
Dispareunia: Si _____, No: _____, Tiempo de aparición: _____
Hemorragia Póscoital: Si _____, No: _____, Tiempo de aparición: _____
Numero de apositos o toallas utilizadas durante el día: _____
Menarca: _____, Ciclos: _____, IVSA: _____
Numero de parejas sexuales: _____
Gestas: _____, Partos: _____, Cesáreas: _____, Abortos: _____
Nacidos vivos: _____, Nacidos muertos: _____
Complicaciones durante el embarazo: _____
Citologías realizadas: Si _____, No _____, Fecha: ____/____/____:
MPF: Si _____, No: _____, Especifique: _____, Duracion: _____ años.
Numero de parejas sexuales: _____
Gestas: _____, Partos: _____, Cesáreas: _____, Abortos: _____
Nacidos vivos: _____, Nacidos muertos: _____
Complicaciones durante el embarazo: _____
Citologías realizadas: Si _____, No _____, Fecha: ____/____/____:
MPF: Si _____, No: _____, Especifique: _____, Duracion: _____ años.

ANEXO 4. Cartas de aprobación del protocolo, consentimientos informados y cuestionario por los comités de ética e investigación del INCAN



CEI: Dom. Av. San Fernando 2, Puerta 1
Col. Barrio del Niño Jesús,
Tlalpan, D.F. C.P. 14080

Comité de Ética en Investigación
Gestión 2013-2016
Registrado ante COFEPRIS 12 CEI 09 014 11
Registrado ante CONBIOÉTICA 06CEI01620110
Office For Human Research Protections (OHRP)
10RUG006100
18B00007248
FWA00019275

Ref. INCAN/ Of. CEI 148/16
Ref. INCAN/ Of. CI 136/16
18 Febrero 2016
CEI/1016

Dr. Jaime Alberto Coronel Martínez
Investigador Principal
Presente

Estimado Dr. Coronel:

Comunicamos a usted que en la Segunda Sesión Ordinaria del Comité de Ética en Investigación, y en la Segunda Sesión Ordinaria del Comité de Investigación se presentó el protocolo: "Evaluación de la microbiota vaginal de mujeres con cáncer cérvicouterino localmente avanzado: Estudio de Casos y Controles". (016/011/ICI)(CEI/1016). Con los siguientes documentos:


- 1.-Formato Único de Protocolo, versión 3 en español de fecha 01 de Febrero del 2016
- 2.-Consentimiento Informado para Mujeres Con Cancer cervicouterino, versión 3 en español de fecha 04 de Diciembre del 2015.*
- 3.-Consentimiento Informado para Mujeres Sin Cancer cervicouterino, versión 3 en español de fecha 04 de Diciembre del 2015.*
- 4.-Anexo 1: Cuestionario versión 2 en español de fecha 01 de Octubre del 2015.*


Los miembros del comité decidieron que los documentos revisados cumplen con los aspectos de carácter ético, se describe el riesgo/beneficio del protocolo, así como la garantía y bienestar de los sujetos en el consentimiento Informado, por lo que decidieron:

"Aprobarlo"

Esta aprobación tiene vigencia hasta el 18 de Febrero del 2017, por lo que en caso necesario le solicitamos atentamente someter su renovación anual antes de esta fecha, junto con un informe de los resultados obtenidos. También será necesario informar al comité cualquier información derivada del estudio que deba ser informada a los participantes. Así mismo le comunicamos que al realizar este proyecto adquiere el compromiso ineludible de informar a los Comités y la Dirección de Investigación de los avances de su proyecto, las presentaciones en congresos nacionales, así como sus publicaciones. De acuerdo a los lineamientos de regulación internos, buenas prácticas clínicas y políticas de operación del Comité de Ética en Investigación del INCAN, es indispensable hacer de su conocimiento que cualquier miembro de los Comités que participa en un proyecto de investigación NO tiene VOZ ni VOTO en las resoluciones acerca del estudio. (Se requiere informar los avances "Status" de eventos adversos y enmiendas de manera semestral).

Atentamente


Dra. Myrna G. Candelaria Hernández
Presidente del Comité de Ética


Dr. Noel Jaime Castañeda Soto
Secretario Técnico

Elaborado por el Comité de Ética en Investigación del INCAN
Módulo N/ES*ser

Financiado por el Sistema Nacional de Investigaciones (SNI) del CONACYT
www.incan.edu.mx

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

No. Ref. INCAN/CI/136/16
INCAN/CEI/148/16

Febrero 18' 2016

Dr. Jaime A. Coronel Martínez
Investigador Principal
Presente.

Comunicamos a usted que en la **Segunda Sesión Ordinaria del Comité de Investigación** y en la Segunda Sesión Ordinaria del Comité de Ética en Investigación, se presentó el Formato Único de Protocolo: "Evaluación de la microbiota vaginal de mujeres con cáncer cérvicouterino localmente avanzado: Estudio de casos y controles.", (016/011/ICI) (CEI/1016/16).

Los miembros del Comité de Investigación decidieron que los siguientes documentos revisados cumplen con los aspectos de confirmación de la calidad técnica y merito científico del protocolo.

Se revisaron los siguientes documentos:


- **Formato Único de Protocolo**, versión 3 de fecha 01 de febrero de 2016, en español
- **Consentimiento Informado para mujer sin cáncer cervicouterino**, versión 3 de fecha 04 de diciembre del 2015, en español
- **Consentimiento Informado para paciente con cáncer cervicouterino**, versión 3 de fecha 04 de diciembre del 2015, en español
- **Anexo 1. Cuestionario**, versión 2 de fecha 01 de octubre de 2015, en español

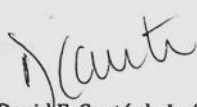
Los miembros de los mismos decidieron:

Aprobarlo

Esta aprobación tiene vigencia hasta el 17 de Febrero del 2017, por lo que en caso necesario le solicitamos atentamente someter su renovación anual antes de esta fecha. Así mismo le comunicamos que al realizar este proyecto adquiere el compromiso ineludible de informar a los Comités y la Dirección de Investigación de los avances de su proyecto, las presentaciones en congresos nacionales, así como sus publicaciones.

Atentamente


Dr. Luis A. Herrera Montalvo
Presidente del Comité de Investigación


Dr. David F. Cantú de León
Secretario Técnico del Comité de Investigación



CEI: Dom. Av. San Fernando 2, Puerta 1
Col. Barrio del Niño Jesús,
Tlalpan, D.F. C.P. 14080

Comité de Ética en Investigación
Gestión 2013-2016
Registrado ante COFEPRIS 12 CEI 09 014 11
Registrado ante CONBIOÉTICA 09CEI0162013042-4
Office For Human Research Protections (OHRP)
IORG0006100
IRB00007348
FWA00019235

Ref. INCAN/ Of. CEI 148/16
Ref. INCAN/ Of. CI 136/16
18 Febrero 2016
CEI/1016

Dr. Jaime Alberto Coronel Martínez
Investigador Principal
P r e s e n t e

Estimado Dr. Coronel:

Para certificar que en la **Segunda Sesión Ordinaria del Comité de Ética en Investigación**, los siguientes miembros participaron en la evaluación de los aspectos éticos y se comprometen a guardar la confidencialidad relacionada con el protocolo:

"Evaluación de la microbiota vaginal de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado: Estudio de Casos y Controles". (016/011/ICI)(CEI/1016). Así mismo señalaron no tener conflicto de intereses en esta evaluación.

Atentamente:

Dra. Myrna Gloria Candelaria Hernández, Presidente: _____

Dr. Noel Castañeda Soto, Secretario: _____

Dra. María Teresa Ramírez Ugalde, Vocal: _____

Dra. Soledad Alejandra Velázquez Zaragoza, Vocal por parte de la Comunidad _____

Dra. Dulce Ma. De Guadalupe Martínez López, Vocal _____

Dra. Alejandra Monroy López; Vocal _____

Dra. Ma. del Carmen Lizeth León Castillo _____