



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Departamento de Estudios Avanzados
Maestría en Ciencias de la Salud

“Detección de *Lactobacillus* spp. en muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con y sin cáncer cervicouterino”

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

Lic. Nutrición Cristian Eduardo Guadarrama Sánchez

Comité de Tutores

Directora de tesis: Dra. Ninfa Ramírez Durán

Co-Director: Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Asesor: Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo

Aviso de autoría

Yo, **Cristian Eduardo Guadarrama Sánchez**, autor responsable de la presente **Tesis**, la cual lleva como título “Detección de *Lactobacillus* spp. en muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con y sin cáncer cervicouterino”, y en representación de los coautores:

- a) **Dra. Ninfa Ramírez Durán,**
- b) **Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez, y**
- c) **Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo**

Declaro que la información presentada en este documento es resultado de un protocolo de investigación del cual soy representante, y por tanto me responsabilizo legalmente por el contenido en caso de plagio, deslindando de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma del Estado de México.

ÍNDICE

	No. Página
AVISO DE AUTORÍA	2
RESUMEN	4
SUMMARY	6
1. ANTECEDENTES	7
1.1. Cáncer	7
1.1.1. Cáncer Cervicouterino	8
1.1.2. Epidemiología del CaCU	8
1.2. Microbiota	9
1.2.1. Microbiota cervicovaginal	9
1.2.2. Disbiosis de la microbiota cervicovaginal	10
1.3. Nuevas técnicas para el estudio de la microbiota	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	15
5. JUSTIFICACIÓN	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1. Diseño de estudio	18
6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	18
6.3. Procedimientos	19
6.3.1. Procesamiento de las muestras	19
6.3.2. Extracción de ADN metagenómico	19
6.3.3. Electroforesis para evaluar la presencia del ADN metagenómico	20
6.3.4. Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría	20
6.3.5. Detección de ADN bacteriano mediante amplificación del gen 16S rRNA	21
6.3.6. Amplificación de iniciadores específicos mediante PCR	21
6.3.7. Identificación de <i>Lactobacillus</i> spp. mediante secuenciación	24
6.4. Variables de Estudio	25
6.5. Implicaciones Bioéticas	27
6.6. Recolección de Datos	27
6.7. Análisis Estadístico	28
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
8. ANEXOS	33
8.1. Carta de envío del artículo	33
8.2. Resumen del artículo	34

RESUMEN

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad por cáncer es de las principales causas de mortalidad en el mundo. En México, el cáncer cervicouterino (CaCU) ocupa el segundo lugar en mujeres de edad reproductiva, causando la muerte de más de 5,000 mujeres al año.

El cáncer es un conjunto de enfermedades donde las células se multiplican descontroladamente produciendo la pérdida de la función tisular. En cuanto al CaCU, se conoce que la infección persistente por el virus del papiloma humano (VPH) es una de sus principales causas. Aunque se ha identificado que el VPH es un factor necesario mas no un determinante para el desarrollo de CaCU, se ha propuesto que la adquisición y posterior instalación de este virus, tiene una estrecha relación con la disbiosis de la microbiota cervicovaginal, en particular la pérdida de especies de *Lactobacillus*, microorganismos que han sido comúnmente relacionados con en el mantenimiento de la salud ginecológica. No obstante, a pesar de los avances en el estudio de la microbiota vaginal, actualmente no existen estudios que hayan evaluado la microbiota lactobacilar (ML) normal en mujeres mexicanas, además de cómo esta se modifica durante el CaCU y posterior a recibir tratamiento farmacológico.

Objetivo: Evaluar la prevalencia de *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* (*Lactobacillus* spp.) mediante la identificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y utilizando iniciadores específicos en ADN metagenómico extraído de muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con y sin CaCU.

Método: Se extrajo el ADN metagenómico de 128 muestras de exudado cervicovaginal, obtenidas previamente en el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan). Se dividieron las muestras en 2 grupos: Grupo Control (n=60) y Grupo de estudio (n=68). Se analizó la integridad, concentración y pureza del ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa y micro-espectrofotometría. Una vez cuantificado el ADN, se realizó la detección de *Lactobacillus* spp. mediante PCR, utilizando iniciadores específicos para cada especie.

Resultados: Se encontró que en el grupo control, la especie más frecuentemente detectada fue *Lactobacillus acidophilus* (95%, n=57), mientras que en grupo de estudio fue *Lactobacillus iners* (97.1% n=53). Por otro lado, las especies menos detectadas en el grupo control fueron *L. gasseri* y *L. jensenii* (18.3% n=11), mientras que en el grupo de estudio fue *L. jensenii* (0%, n=0). También se observaron diferencias significativas en la presencia de *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii* en ambos grupos (p<0.001, p=0.001 y p<0.001 CI 99% respectivamente).

Conclusión: Se encontró que en la microbiota cervicovaginal de mujeres mexicanas sanas, las 5 principales especies de *Lactobacillus* asociadas con salud vaginal están presentes. También se demostró que al diagnóstico de CaCU localmente avanzado hay una diferencia significativa en la presencia de *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii*.

SUMMARY

According to the World Health Organization, cancer disease is one of the main causes of mortality in the world. In Mexico, cervical cancer (CaCU) ranks second in women of reproductive age, causing the death of more than 5,000 women per year.

Cancer is a group of diseases where cells multiply uncontrollably causing the loss of tissue function. As for CaCU, it is known that persistent infection by the human papillomavirus (HPV) is one of its main causes.

Although HPV has been identified as a necessary factor but not a determinant for the development of CC. It has been proposed that the acquisition and subsequent installation of this virus has a close relationship with dysbiosis of the cervicovaginal microbiota, particularly loss of *Lactobacillus* species, microorganisms that are commonly related with the maintenance of gynecological health.

However, despite advantages in the study of the vaginal microbiota, there are currently no studies that have evaluated the normal lactobacillary microbiota in Mexican women, in addition to how it is modified during CC and after receiving pharmacological treatment.

Objective: To assess the prevalence of *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* and *L. jensenii* (*Lactobacillus* spp.) by identification by polymerase chain reaction (PCR) and using specific primers in extracted metagenomic DNA of samples of cervicovaginal exudate from women with and without CC.

Results: It was found that in the control group, the most frequently detected species was *Lactobacillus acidophilus* (95%, n = 57), while in the study group it was *Lactobacillus iners* (97.1% n = 53). On the other hand, the least detected species in the control group were *L. gasseri* and *L. jensenii* (18.3% n = 11), while in the study group it was *L. jensenii* (0%, n = 0).

Significant differences were also observed in the presence of *L. crispatus*, *L. gasseri* and *L. jensenii* in both groups (p <0.001, p = 0.001 and p <0.001 CI 99% respectively).

Conclusion: It was found that in the cervicovaginal microbiota of healthy Mexican women, the 5 main *Lactobacillus* species associated with vaginal health are present. It was also demonstrated that at the diagnosis of locally advanced CaCU there is a significant difference in the presence of *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri* and *L. jensenii*.

1. ANTECEDENTES

1.1. Cáncer

El cáncer se define como un conjunto de patologías cuya principal característica fisiopatogénica es la multiplicación celular rápida y descontrolada ¹. La principal causa asociada al cáncer es de origen genético (ya sea de etiología intrínseca o ambiental). De manera general las mutaciones provocan que las células cancerígenas alcancen un nivel de especialización menor que sus contrapartes sanas. Estas mutaciones incapacitan a la célula para controlar sus funciones, especialmente las de crecimiento y reproducción (cada organismo acumula distintas mutaciones genéticas a lo largo de su vida que pueden o no desarrollar cáncer) ². El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido corporal y extenderse a través del torrente sanguíneo o los canales linfáticos invadiendo tejidos adyacentes o propagándose a otros órganos ³.

En condiciones normales, las células senescentes o dañadas son eliminadas para dar lugar a células nuevas. Durante el cáncer, esas células se mantienen vivas y disfuncionales, además debido a que las células cancerígenas tienen baja especialización, hay una sobreproducción de células que da como resultado la formación de neoplasias o tumores, que llevan a la disminución o pérdida de la función tisular ³.

A diferencia de los tumores benignos que no se propagan o invaden tejidos adyacentes, las células que forman tumores malignos generalmente afectan tejidos cercanos y llevan a la formación de tumores en otros sitios ⁴. Actualmente, se conocen más de 100 tipos de cáncer que reciben su nombre de acuerdo al sitio donde se desarrollan ⁵. También, existen categorías generales para tipos celulares específicos como el carcinoma que se genera en la piel y el tejido epitelial, el sarcoma que es originado en los huesos y tejidos blandos (cartílagos, tejido graso, músculos y vasos sanguíneos), la leucemia en la médula ósea, la cual no desarrolla tumores sólidos y el linfoma que afecta a las células del sistema inmunológico ^{4, 6-8}.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es considerado como una de las principales causas de mortalidad en el mundo y en el 2015 provocó la muerte de más de 8 millones de personas ².

1.1.1. Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCU) se desarrolla en las inmediaciones del epitelio columnar del endocervix y el epitelio escamoso del ectocervix en una región epitelial de cambios morfológicos constantes conocida como zona de transformación ⁹.

Actualmente se ha identificado que el virus del papiloma humano (VPH), el tabaquismo, el inicio temprano de la vida sexual, las múltiples parejas sexuales, las infecciones de transmisión sexual y el uso de anticonceptivos orales, son factores estrechamente relacionados con el desarrollo de CaCU ¹⁰⁻¹⁴.

Entre los factores causantes del CaCU, el de mayor importancia es la infección persistente por VPH ^{15, 16}. La agresividad del VPH depende del tipo de virus. Se ha descubierto que las cepas con mayor capacidad carcinogénica son el VPH 16 (observado en más del 50% de los casos de CaCU) y el VPH 18 (observado en el 15% de los casos) ^{12, 13}. Cabe mencionar que la presencia del VPH es un factor necesario, más no determinante para el desarrollo de CaCU, una mujer puede ser positiva al VPH sin tener CaCU, por lo que no se puede generalizar la presencia del VPH como única causa de la enfermedad ⁶.

El carcinoma celular escamoso y el adenocarcinoma son los tipos de CaCU más comunes ¹⁷. En etapas iniciales, el daño producido por el VPH se manifiesta con cambios atípicos y de bajo grado en el epitelio cervical denominado neoplasia intraepitelial cervical 1 o 2 (NIC 1-2). Estas alteraciones no están directamente relacionadas con cáncer. Sin embargo, cuando el daño es persistente estas neoplasias pueden progresar a NIC 3, que es una lesión de alto grado y se considera equivalente a CaCU ⁶.

1.1.2. Epidemiología del CaCU

Se ha identificado que el cáncer cervicouterino está entre los cuatro principales tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial con más de 500 mil casos nuevos cada año ¹⁸. Además, es la cuarta causa de muerte por cáncer con 266,000 muertes por año ⁶.

Alrededor del 70% de la carga global de CaCU se concentra en países de bajo Índice de Desarrollo Humano (IDH), entre los que destacan países de África, Asia y América Latina ¹⁸. En

México, desde el 2006, el CaCU ocupa el segundo lugar en neoplasias malignas en mujeres de edad reproductiva con 13,960 casos al año e incidencia de 23.3 casos por cada 100 mil mujeres¹⁹. A pesar de que en el país, la incidencia del CaCU ha disminuido desde el año 2000, éste continúa siendo un importante problema de salud y tan solo en el 2013 se registraron más de 3 mil defunciones en mujeres de 25 años en adelante, con una tasa de mortalidad de 11.3 defunciones por cada 100 mil mujeres⁷. Similar a lo que sucede en otros países de bajo índice de desarrollo humano (IDH), la mayoría de los casos de CaCU son detectados en etapas avanzadas (estadios IIB-IVA), lo que disminuye la tasa de remisión y conlleva al inicio de tratamiento con terapias más agresivas⁸.

1.2. Microbiota

Es bien sabido que los microorganismos están distribuidos en entornos donde la vida pareciera imposible de desarrollarse. Se cree que, desde principios de la historia estos microorganismos (principalmente bacterias) representaron la única forma de vida en la tierra y han contribuido al desarrollo de formas de vida más complejas, incluidos los seres humanos²⁰.

Se ha demostrado que en el ser humano existe una gran cantidad de especies de microorganismos (bacterias, hongos, parásitos, virus, etc.) que colonizan diversos sitios anatómicos y contribuyen a diversas funciones fisiológicas²⁰. De hecho, se ha calculado que en una persona promedio habitan aproximadamente 3.8×10^{13} bacterias (sin considerar otras formas de microorganismos)²¹.

La microbiota es la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado²². La microbiota puede establecer relaciones simbióticas con los organismos mayores que coloniza o por otro lado disbiosis, que hace referencia a las alteraciones de la microbiota y la respuesta adversa del huésped a estos cambios²².

1.2.1. Microbiota cervicovaginal

Similar a lo que ocurre en otros sitios anatómicos, en el tracto cervicovaginal la microbiota prevalece mediante simbiosis con las células de la barrera epitelial. Las comunidades bacterianas obtienen nutrimentos derivados de la descamación celular del epitelio cervicovaginal y del moco producido por glándulas secretoras²³.

La microbiota cervicovaginal (MCV) es considerada como la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos y se ha encontrado que la presencia de estirpes bacterianas productoras de ácido láctico contribuye en gran medida a la protección del epitelio cervicovaginal contra agentes patógenos, incluido el VPH²³⁻²⁶. Diversos estudios han determinado que la MCV de mujeres sanas se encuentra dominada por bacterias anaerobias pertenecientes al género *Lactobacillus*^{27,28}.

Uno de los estudios con mayor impacto en el estudio de la MCV fue el realizado por Ravel *et al.* en 2011, en el cual, mediante secuenciación masiva de alto rendimiento, caracterizaron la MCV de 396 mujeres asintomáticas y sexualmente activas. Las mujeres representaron cuatro grupos étnicos distintos donde en un grupo se incluyeron a mujeres latinas. Los autores descubrieron que la MCV en estado no patológico se distribuye en cinco Tipos de Estado de la Comunidad (CSTs por sus siglas en inglés) de acuerdo a la especie dominante. Estos grupos fueron: Grupo I (dominado por *Lactobacillus crispatus*), Grupo II (dominado por *Lactobacillus gasseri*), Grupo III (dominado por *Lactobacillus iners*), Grupo IV (dominado por diversas especies anaerobias incluidas *Lactobacillus*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* y *Sneathia*) y el grupo V (dominado por *Lactobacillus jensenii*)²⁷.

Adicionalmente Smith *et al.* en 2012, evaluaron muestras vaginales de mujeres hispanas durante siete años con distintas metodologías de secuenciación masiva buscando caracterizar su MCV²⁹. Los CST que designaron fueron muy similares a los del estudio de Ravel *et al.* en 2011. Sin embargo, no identificaron el grupo V (dominado por *L. jensenii*). Adicionalmente, encontraron tres grupos más; el CST VI dominado por *G. vaginalis*, el CST VII dominado por *G. vaginalis* y *Lactobacillus* spp., y el tercero que denominaron IIIb, el cual era diferente del grupo III, pero también dominado por *L. iners*³⁰.

1.2.2. Disbiosis de la microbiota cervicovaginal

Entre los muchos factores que influyen en la disbiosis de la MCV, las prácticas sexuales de riesgo se asocian con una mayor diversidad de la MCV y pérdida de *Lactobacillus* spp., que contribuye al incremento de infecciones de transmisión sexual incluido el VPH³¹.

Diversos estudios han demostrado que la salud cervicovaginal está estrechamente relacionada con las comunidades bacterianas que habitan de forma normal el tracto cervicovaginal. Cada vez existe más información de la relación de la MCV y el CaCU ³²⁻³⁴.

Se ha identificado que la diversidad bacteriana a nivel vaginal es más compleja en mujeres positivas a VPH en comparación con mujeres sanas ³⁵ y se ha propuesto que la adquisición y progresión del VPH como factor asociado al CaCU, está estrechamente relacionado con la disbiosis de la MCV ^{11, 18}. Un ejemplo de esta relación es el trabajo realizado por Audirac *et al.* en 2016., donde se demostró que, en mujeres negativas al VPH, la MCV fue dominada por *Lactobacillus spp.*; mientras que, en las mujeres positivas al VPH, la abundancia relativa fue menor ³⁶.

Por otro lado, Mitra *et al.* en 2015, concluyeron que la severidad de las lesiones previas a desarrollar CaCU (NIC 1 o 2) se asocian con un aumento en la diversidad de la microbiota vaginal y podrían estar involucradas en la persistencia y progresión del VPH; adicionalmente encontraron que a mayor grado de NIC la abundancia relativa de *Lactobacillus* es menor ³⁷.

Otros estudios han evaluado la presencia de especies de *Lactobacillus* en diferentes etapas de NIC y CaCU, descubriendo que en la transición de NIC a CaCU, las especies de *Lactobacillus* se modifican y en general disminuyen conforme se va incrementando la enfermedad ³⁶⁻³⁸.

Una revisión donde se incluyeron veintinueve estudios relacionados con *Lactobacillus* y CaCU, menciona que la presencia de CaCU y otras lesiones asociadas están estrechamente relacionadas con una mayor presencia de *Lactobacillus iners* y con una baja abundancia de *Lactobacillus jensenii* y *L. crispatus*. Dos de las investigaciones revisadas en el mismo estudio determinaron que la abundancia de *Lactobacillus* en mujeres con VPH era inferior en comparación con mujeres sanas ³⁹.

Los estudios de relación entre la microbiota vaginal y la incidencia de CaCU no se limitan únicamente a la presencia o ausencia de géneros bacterianos. En 2017 Li *et al.*, encontraron que las especies de *Lactobacillus* tienen la capacidad de inhibir la migración de líneas celulares de CaCU a otros tejidos ⁴⁰.

1.3. Nuevas técnicas para el estudio de la microbiota

Con auge en el siglo XXI, una forma de estudiar las comunidades bacterianas de forma más eficiente es mediante las técnicas de secuenciación de nueva generación²⁰; estas técnicas utilizan como base la amplificación de genes por PCR^{41, 42}.

Hasta hace algunos años, muchos de los aspectos necesarios para comprender la relación entre los microorganismos y los seres humanos permanecieron inexplorados. Esto debido a la dificultad que representaba el cultivo y aislamiento de la gran mayoría de especies microbianas. Algunos estudios han comparado los hallazgos obtenidos a través de técnicas independientes de cultivo y técnicas tradicionales, encontrando que el cultivo es una técnica menos potente para la identificación de especies bacterianas, en especial en condiciones patológicas³³.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCU representa más del 9% de las neoplasias malignas en el mundo y en México es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado en mujeres adultas, con una alta tasa de mortalidad. A diferencia de los países con alto IDH, donde hasta el 75% de los casos de CaCU logran éxito en el tratamiento; en México existe una baja tasa de detección temprana, lo que hace que los tratamientos se inicien en etapas avanzadas reduciendo la tasa de remisión apenas al 5%.

Pese a que aún no se conocen con exactitud las causas asociadas al desarrollo del CaCU, se sabe que la disbiosis de la microbiota cervicovaginal, en particular la pérdida de especies de *Lactobacillus* influye de alguna manera en el desarrollo y la severidad del CaCU y que la presencia de estas especies bacterianas se ve modificada en lesiones precancerosas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).

Se ha buscado establecer las características taxonómicas de una microbiota cervicovaginal sana. Sin embargo, los resultados varían de acuerdo a las características clínicas, sexuales y demográficas de las mujeres alrededor del mundo.

Actualmente hay poca información acerca de la microbiota cervicovaginal de mujeres mexicanas y no existen estudios que evalúen, utilizando técnicas independientes de cultivo, qué especies de *Lactobacillus* son representativas de mujeres sin CaCU y si estas prevalecen en etapas avanzadas de CaCU.

Pregunta de investigación: ¿Existe diferencia en la presencia de especies de *Lactobacillus* detectadas en muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con y sin CaCU?

3. HIPÓTESIS

H_0 : No existe diferencia en la prevalencia de especies de *Lactobacillus* detectadas en muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con y sin CaCU.

H_1 : Existe diferencia en la prevalencia de especies de *Lactobacillus* detectadas en muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con y sin CaCU.

4. OBJETIVOS

General:

Detectar la presencia de *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* mediante PCR y utilizando iniciadores específicos en ADN metagenómico extraído de muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con y sin CaCU.

Específicos:

1. Extraer el ADN metagenómico de 128 muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con y sin CaCU.
2. Detectar la presencia de *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* mediante PCR.
3. Confirmar la identificación de *Lactobacillus* spp. por análisis de secuenciación de los productos amplificados.
4. Comparar las especies de *Lactobacillus* detectadas entre los grupos de muestras con y sin CaCU.
5. Analizar las diferencias en la presencia de *Lactobacillus* spp. en ambos grupos mediante Chi² de Pearson.

5. JUSTIFICACIÓN

El CaCU es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado a nivel mundial, con una tasa de muerte del 25%. En el 2018 se calcularon más de 500 mil casos nuevos alrededor del mundo causando 311 mil muertes. En México, el CaCU representa un problema de salud pública y desde la última década se ubica como el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres adultas, con más de 13 mil casos por año e incidencia de 23.3 casos por cada 100 mil mujeres. En cuanto a la mortalidad por CaCU en México en el año 2013 se registraron más de 3 mil muertes con una tasa de 11.3 defunciones por cada 100 mil mujeres.

Debido a que el CaCU no tiene síntomas característicos o fácilmente identificables en su etapa inicial, la gran mayoría de los casos se detectan en estadios avanzados; esta falta de detección temprana complica su manejo y reduce la tasa de remisión a menos del 5%.

El conocimiento actual sobre la enfermedad y su fisiopatología ha llevado a distintas hipótesis sobre su desarrollo. La disbiosis de la microbiota cervicovaginal como un factor que impacta la ocurrencia, progresión y severidad del CaCU ha encontrado interés en los últimos años. Es necesario ampliar el conocimiento acerca de la relación de la microbiota cervicovaginal con la salud vaginal y conocer qué especies bacterianas caracterizan una “microbiota cervicovaginal normal o sana”, particularmente en mujeres mexicanas. Esto podría llevar a un mejor entendimiento de la disbiosis como un factor de establecimiento y desarrollo del CaCU.

En diversas regiones del mundo se ha identificado que la microbiota vaginal de mujeres sanas está dominada por especies del género *Lactobacillus*, particularmente *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri* y *L. iners*. Sin embargo, estos hallazgos no han sido comprobados en la población mexicana y hay pocos estudios que evalúen la presencia de *Lactobacillus* sp. en la microbiota vaginal de mujeres mexicanas sanas.

Por otro lado, no existen trabajos que evalúen si en mujeres mexicanas las especies de *Lactobacillus* consideradas parte de la microbiota vaginal normal prevalecen en presencia de CaCU localmente avanzado y cómo se modifican ante distintos tratamientos antineoplásicos.

Con el avance de las técnicas moleculares y las técnicas independientes de cultivo se puede tener una mayor especificidad en la perspectiva de la detección de especies bacterianas y del estudio de la microbiota cervicovaginal.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño de estudio

- Estudio transversal, observacional, descriptivo y comparativo.
- Método de muestreo: No probabilístico por conveniencia.
- Universo: Muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con y sin CaCU del Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan).
- Tamaño de muestra: 128 muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con y sin CaCU.

6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios inclusión:

- Muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con CaCU localmente avanzado de reciente diagnóstico provenientes del INCan.
- Muestras de exudado cervicovaginal de mujeres sin CaCU provenientes del INCan.

Criterios exclusión:

- Muestras de exudado cervicovaginal cuyo contenedor se encontraba abierto, dañado, o el contenido estuviera expuesto de alguna forma.
- Muestras de exudado cervicovaginal de volumen menor a 5 μ L.

Criterios eliminación:

- Muestras de exudado cervicovaginal cuyo ADN no cumpliera con los parámetros de calidad evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría.
- Muestras cuya información no estuviera en la base de datos.

6.3. Procedimientos

6.3.1. Procesamiento de las muestras

Las muestras de exudado cervicovaginal se mantenían congeladas en solución salina a -80°C en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la UAEMéx. Posteriormente en un medio estéril, los exudados fueron colocados en tubos Eppendorf® de 1.5 ml con 500 μL de la solución salina en la que estaban contenidos y 500 μL de glicerol al 40%. Finalmente, se almacenaron a -20°C para ser utilizados en las pruebas.

6.3.2. Extracción de ADN metagenómico

Las muestras almacenadas a -20°C se utilizaron para realizar la extracción de ADN metagenómico mediante el kit QIamp® UCP Pathogen Mini (Cat: 50214, QIAGEN). El protocolo que se llevó a cabo para cada muestra fue el siguiente:

1. Se descongeló la muestra a temperatura ambiente en un medio aséptico
2. Se añadieron 500 μL de buffer ATL
3. Se colocó el tubo en un termoagitador y se incubó durante 10 min a 56°C con agitación continua a 500 rpm
4. Se mezcló en agitador mecánico (vórtex®) durante 10 s
5. Se transfirieron 500 μL del líquido a un tubo nuevo de 2 mL
6. Se agregaron 40 μL de proteinasa K y se mezclaron en vórtex® por 10 s
7. La muestra se incubó a 56°C por 10 min, sin agitación
8. Se añadieron 210 μL de buffer APL2 al tubo y se mezcló en vórtex® por 30 s
9. Se incubó a 70°C por 10 min, sin agitación (se centrifugó brevemente para quitar las gotas de la tapa)
10. Se añadieron 320 μL de etanol al lisado y se mezcló en vórtex® por 30 s
11. Se aplicaron 600 μL de la mezcla anterior a una mini columna ensamblada en un tubo colector de 2 ml y se colocó en la centrífuga a 8000 rpm por un minuto
12. Se desechó el líquido que quedó en el tubo y se descartó el tubo que contenía el filtrado
13. Se repitió el paso 12 aplicando el restante del paso 11 a la mini columna y se colocó un tubo nuevo de 2 mL

14. Cuidadosamente se abrió la mini columna y se añadieron 600 μ L de buffer APW1 sin tocar las paredes. Se cerró la tapa y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 minuto
15. Se colocó la mini columna en un nuevo tubo colector de 2 mL y se descartó el tubo que contenía el filtrado
16. Cuidadosamente se abrió la mini columna y se añadieron 730 μ L de buffer APW2 sin tocar la membrana ni las paredes, se centrifugó a 14000 rpm durante 3 min
17. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se descartó el tubo anterior. Se centrifugó nuevamente a 14000 rpm durante 1 minuto
18. Se incubó el ensamblaje a 56°C por 3 min (sin movimiento) para secar la membrana completamente
19. Se colocó la mini columna en un tubo de 1.5 mL con tapa y se descartó el tubo anterior
20. Cuidadosamente se aplicó 75 μ L de buffer AVE en el centro de la membrana sin tocar las paredes
21. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min
22. Se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto para eluir el ADN
23. Se repitieron los pasos 20-22 para dar un total de 150 μ L de ADN metagenómico

6.3.3. Electroforesis para evaluar la presencia del ADN metagenómico

La presencia e integridad del ADN extraído se observó mediante electroforesis en gel de agarosa (Conda Pronadisa, Cat: 8100.10) al 1% con buffer TAE (TAE buffer 1X Invitrogen, N° de catálogo: 24710-030) teñido con Bromuro de etidio a 1 mg/mL (SIGMA, Cat: E7637-1G) con condiciones 120V/300mA/50W/40min. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (Thermo Scientific, Cat: 5M0311) y se agregaron 3 μ L del ADN metagenómico y 5 μ L de buffer de carga a cada pozo. El gel se visualizó en un transluminador de luz ultravioleta de la marca SYNGENETM, Synoptics Ltd. Serie SYGV/4779.

6.3.4. Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría

Se analizó la concentración y la pureza de todas las muestras de ADN metagenómico extraído de los exudados vaginales mediante espectrofotometría. El escaneo UV se realizó por grupos de 10 muestras y dos blancos añadiendo 3 μ L de ADN metagenómico y 2 μ L de blanco (buffer de elusión AVE (QIAGEN, Cat. 1020953) compuesto por agua libre de nucleasas con 0.04% de azida de sodio). Se utilizó un espectrofotómetro EPOCH de la marca BioTek Instruments®. La

concentración de las muestras se calculó a longitud de onda de 260 nm, mientras que el nivel de pureza fue calculado mediante las relaciones de absorbancia a 260/280 nm (para evaluar contaminación por compuestos aromáticos, proteínas y ARN) y a 230/260 nm (para evaluar contaminación con sales caotrópicas, fenoles y carbohidratos). El escaneo se llevó a cabo a longitudes de onda de 260 a 280 nm y 230 a 260 nm ⁴³.

6.3.5. Detección de ADN bacteriano mediante amplificación del gen 16S rRNA

Se amplificó el gen 16S rRNA en 10 muestras de ADN metagenómico elegidas al azar (5 de cada grupo), como método de confirmación de presencia de ADN bacteriano. Para esto, se utilizaron iniciadores universales para microorganismos bacterianos 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGCTACCTTGTTAGCGACTT-3') ⁴⁴. Las reacciones de PCR incluyeron ADN bacteriano como control positivo y agua libre de nucleasas como control negativo. Los amplicones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 120V/300mA/50W/30 min. Se agregaron 5 µL de producto de amplificación y 5 µL de buffer de carga.

Una vez verificada la presencia bacteriana y la calidad del ADN metagenómico, se procedió a la amplificación de iniciadores específicos para *Lactobacillus* spp. mediante PCR de punto final.

6.3.6. Amplificación de iniciadores específicos mediante PCR

Para la amplificación de los iniciadores específicos para las especies de *Lactobacillus* mediante PCR, se utilizó un termociclador MaxyGenII (Axygen®), Taq ADN Polimerasa (My taq®, Bioline, Cat: BIO-21105) como enzima de síntesis y buffer de reacción (My Taq®, Bioline, Cat: BIO-21106) compuesto por dNTPs (5 mM), MgCl₂ (15 mM), estabilizadores y promotores de síntesis. Se mezclaron los reactivos con el ADN molde en tubos Eppendorf® de 200µL, obteniendo un volumen final de 25 µL por reacción. Las características de los iniciadores se muestran en el Cuadro 1. Mientras que el cálculo y las condiciones de PCR se muestran en el Cuadro 2.

Con el objetivo de observar la presencia, integridad y tamaño de los productos de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Conda Pronadisa®, cat: 8100.10) al 2% en buffer TAE (TAE

buffer 1X Invitrogen[®], cat: 24710-030), teñida con Bromuro de etidio a concentración de 1mg/ml (SIGMA, cat: E7637-1G), condiciones 120V/300mA/50W/50 min y utilizando un marcador de peso molecular de 50 pb (BIO BASIC[®] 50-500bp Low Range DNA Marker. Cat. GM305). Se agregaron 8 µL de producto de amplificación y 5 µL de buffer de carga. El gel se observó en un transluminador de luz ultravioleta de la marca SYNGENE[®], Synoptics Ltd. Serie. SYGV/4779), se tomó una fotografía del mismo y se guardó en la base de datos.

Posteriormente, se construyó una base de datos en Excel con el identificador de cada muestra de exudado cervicovaginal de ambos grupos y el resultado de presencia o ausencia de las especies de *Lactobacillus* detectadas.

Cuadro 1. Características de los iniciadores específicos

Espece de <i>Lactobacillus</i>	Nombre del iniciador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño pb
<i>L. acidophilus</i> ³²	Lacto-F	TGGAAACAGRTGCTAATACCG	231-233
	Lacto-R	GTCCATTGTGGAAGATTCCC	
<i>L. crispatus</i> ³²	Lcris-F	AGCGAGCGGAACTAACAGATTTAC	154
	Lcris-R	AGCTGATCATGCGATCTGCTT	
<i>L. jensenii</i> ⁴²	Ljens-F	AAGTCGAGCGAGCTTGCCTATAGA	162
	Ljens-R	CTTCTTTTCATGCGAAAGTAGC	
<i>L. iners</i> ⁴²	Liners-F	CTCTGCCTTGAAGATCGGAGTGC	155
	Liners-R	ACAGTTGATAGGCATCATCTG	
<i>L. gasseri</i> ⁴⁵	Lgass-F	AGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTG	170
	Lgass-R	TCTTTTAAACTCTAGACATGCGTC	

Cuadro 2. Cálculo de las reacciones de PCR para la detección de *Lactobacillus* spp. usando iniciadores específicos.

Especie de <i>Lactobacillus</i>	Reactivo (μL)						Ciclos	Temperatura				
	H ₂ O libre de nucleasas	Buffer	Primer F	Primer R	Polimerasa	ADN molde		Inicio	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	18.3	2.5	1	1	.20	2	30	95°/15min	95°/15seg	62°/1 min	62°/1 min	62°/10 min
<i>L. crispatus</i>	16.3		2	2								
<i>L. gasseri</i>	14.3		3.55	3.55	.10	1	40			63°/1min	72°/1min	72°/10min
<i>L. iners</i>			3.25	3.25	3.25	.20	1.5			65°/1min	65°/1min	65°/10min
<i>L. jensenii</i>	15.8		2.5	2.5	2.5							

6.3.7. Identificación de *Lactobacillus* spp. mediante secuenciación

Dos muestras de producto de amplificación (50 µL cada una) de cada especie de *Lactobacillus* se enviaron al servicio de secuenciación en conjunto con los iniciadores utilizados para su amplificación a la empresa Macrogen (Maryland, USA). Esto con el objetivo de descartar falsos positivos en la amplificación de *Lactobacillus* spp. Previo a la secuenciación los productos de PCR se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega[®], Ref: A9282).

Las secuencias obtenidas se procesaron con el programa BioEdit versión 7.0.5.3 ⁴⁶. Posteriormente, se compararon con las bases de datos de la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) ⁴⁷ y la base de datos EZ BioCloud ⁴⁸.

6.4. Variables de Estudio

Independientes: Cáncer cervicouterino.

Dependientes: Presencia de *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*.

6.4.1. Cuadro 3. Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Organismos procariotas unicelulares Gram positivos, catalasa negativos, de forma bacilar no esporulados, encontrados en diversos sitios anatómicos con propiedades potencialmente benéficas para el hospedador ⁴⁹ .	Organismo bacteriano presente en exudado cervicovaginal	Dependiente nominal cualitativa	Presencia o ausencia	Análisis de frecuencias Chi ² de Pearson
<i>Lactobacillus crispatus</i>		Organismo bacteriano presente en exudado cervicovaginal	Dependiente nominal cualitativa	Presencia o ausencia	Análisis de frecuencias Chi ² de Pearson
<i>Lactobacillus gasseri</i>		Organismo bacteriano presente en exudado cervicovaginal	Dependiente nominal cualitativa	Presencia o ausencia	Análisis de frecuencias Chi ² de Pearson
<i>Lactobacillus iners</i>		Organismo bacteriano presente en exudado cervicovaginal	Dependiente nominal cualitativa	Presencia o ausencia	Análisis de frecuencias Chi ² de Pearson
<i>Lactobacillus jensenii</i>		Organismo bacteriano presente en exudado cervicovaginal	Dependiente nominal cualitativa	Presencia o ausencia	Análisis de frecuencias Chi ² de Pearson
Cáncer Cervicouterino	Cáncer: término genérico designado a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Su característica principal es la multiplicación rápida de células anormales que se puede extender más allá de sus límites habituales y pueden invadir tejidos adyacentes o propagarse a otros órganos ¹ .	Muestras de exudado cervicovaginal de mujeres que presenten cáncer cervicouterino localmente avanzado, estadios 1B2 a IVA.	Independiente nominal cualitativa	Presencia o ausencia	Análisis de frecuencias. Chi ² de Pearson

6.5. Implicaciones Bioéticas

La presente investigación estuvo estrictamente dirigida hacia el respecto a la salud humana y se apegó a los lineamientos de la declaración de Helsinki ⁵⁰ y del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. 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 ⁵¹.

Los consentimientos informados que se utilizaron al momento de la toma de muestra y que se entregaron a las mujeres de las que derivaron las muestras de exudado cervicovaginal, estuvieron aprobados por los Comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Cancerología de México, con claves 016/011/ICI y CEI/1016. Toda información obtenida fue manejada con absoluta confidencialidad.

6.6. Recolección de Datos

La toma de muestra se llevó a cabo de febrero del 2016 a febrero del 2018 en el INCan. Las muestras fueron tomadas mediante hisopado de mucosa epitelial a mujeres con diagnóstico reciente de CaCU localmente avanzado y a sus acompañantes, que fueron mujeres con citología cervical negativa a CaCU. Las muestras de exudado cervicovaginal utilizadas en el presente estudio fueron seleccionadas de manera aleatoria y por conveniencia en el INCan, y transportadas en cadena de frío al Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

Todas las mujeres fueron mayores de 18 años, no estaban embarazadas, no utilizaron antimicrobianos o antifúngicos 30 días previos, no tuvieron relaciones coitales 48 horas previas a la toma de muestra, no utilizaron duchas vaginales y no estaban menstruando. La edad promedio de las mujeres con CaCU fue de 45.92 ± 9.95 años, la etapa clínica de cáncer más frecuente fue IIB en 51.47% de las mujeres (n=35), seguido por IB2 en 16.18% (n=11), IIIB en 13.24% (n=9), IIA1 y IVB en 7.35% (n=5 en ambos) y IIIA en el 4.41% (n=3). El 79.41% menstruaba de forma regular (n=54), 20.59% fumaba (n=14) y 13.24% ingería alcohol (n=9). Los métodos anticonceptivos utilizados por las participantes fueron de barrera 10.2% (n=7),

hormonal oral 20.5% (n=14), DIU 13.2% (n=9), obliteración tubárica 4.4% (n=3). El porcentaje restante (51.4%) no utilizaba métodos anticonceptivos (n=35).

Para el grupo control la media de edad fue de 45.08 ± 8.93 años, 73.33% de las mujeres menstruaba de forma regular (n=44), el 25% fumaba (n=15) y el 35% ingería alcohol (n=21). El método anticonceptivo de elección era de barrera en 25% de los casos (n=15), hormonal oral, DIU y obliteración tubárica en el 8.3% (n=5 para cada método) y el 46.6% no utilizaba algún método anticonceptivo.

6.6.1. Conformación de los grupos de estudio:

Se conformaron 2 grupos de estudio de acuerdo a las características clínicas de las mujeres de estudio al momento de la toma de muestra.

1. Grupo Control: 60 muestras de mujeres sin CaCU.
2. Grupo CaCU: 68 muestras de mujeres con CaCU.

6.7. Análisis estadístico

Los datos generados de la presencia de *Lactobacillus* spp. en las muestras de exudado cervicovaginal se ingresó en una base de datos de Excel y posteriormente fue importada a la versión 12 del programa estadístico Stata (Stata Corp. College Station, Texas U.S.A.)⁵². Se utilizaron estadísticos descriptivos para el análisis de la información. El análisis comparativo de los grupos de estudio fue mediante pruebas de 2 colas, con nivel de significancia ≤ 0.05 . Se utilizó la prueba χ^2 de Pearson⁵³ para la determinación de diferencias de detección entre el grupo de estudio y el grupo control.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Cancer Institute [Internet], NCI dictionary of cancer terms, cancer. [Consultado el 22 de mayo del 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer>
2. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. [Internet]. 2018 [Consultado el 28 de agosto del 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
3. Vogelstein B & Kinzler K. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004; 10(8):789-799.
4. National Cancer Institute, What Is Cancer? [Internet]. [Consultado el 22 de mayo del 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
5. National Cancer Institute, Cancer Types [internet]. [Consultado el 22 de mayo del 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/types>
6. McGuire S. World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for research on Cancer, WHO Press, 2015. *Advances in Nutrition* 2016; 7(2):418-419.
7. Aldaco F, Pérez P, Cervantes G, Torrecillas L. et. al. Mortality from cancer in Mexico: 2015 update. *Gac Mex Oncol*. 2018;17(1):24-30.
8. Montalvo G, Coronel J, Alvarado A, David F. et. al. ONCO-GUÍA Cáncer Cervicouterino. *Cancerología*. 2011; 6:61-69.
9. International Agency for Research on Cancer. A REVIEW OF HUMAN CARCINOGENS. Vol 100B Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France: IARC Monographs; 2012.
10. Veldhuijzen N, Snijders P, Reiss P. et. al. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(12): 862–874.
11. Smith J, Green J, Berrington de González A, et. al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003; 361: 1159–1167.
12. Castellsague X & Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis—role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31: 20–28.
13. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case—control study. *Cancer Causes Control*. 2003; 14: 805–14.

14. Shew M, Ermel A, Weaver B, et. al. Association of *Chlamydia trachomatis* infection with redetection of human papillomavirus after apparent clearance. *J infect Dis.* 2013; 208(9):1416-21.
15. Silva C, Souza E, de Castro E, Machado V, et. al. A retrospective study on cervical intraepithelial lesions of low-grade and undetermined significance: evolution, associated factors and cytohistological correlation. *Sao Paulo Med J.* 2014; 132(2): 92–96.
16. López A & Soberón M. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología.* 2006; 1(1): 31–55.
17. Chai S, Pua K, Saleh A, et. al. Clinical significance of plasma Epstein-Barr Virus SNA loads in a large cohort of Malaysian patients with nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Virol.* 2012; 55(1): 34-39.
18. International Agency for Research on cancer [Internet]. GLOBOCAN 2018, Cancer Incidence and mortality statistics worldwide and by region. 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon CEDEX 08, France. 2018. [Consultado en marzo del 2018]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf>
19. Secretaria de Salud de México [Internet]. Cáncer de Cuello Uterino. Lieja 7 Alcaldía Cuauhtémoc, Colonia Juárez, Ciudad de México C.P. 06600. 08 de septiembre de 2015. [Revisado 2015; Consultado abril 2019]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/cancer-de-cuello-uterino>
20. Sanders M. World Gastroenterology Organization's Handbook on Gut Microbes-Probiotics: The Concept. World Gastroenterology Organization. 2014;1(414): 1–66.
21. Sender R, Fuchs S & Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016; 14(8): 1–14.
22. Icaza M. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México.* 2013; 78(4): 240–248.
23. Breshears L, Edwards V, Ravel J & Peterson M. *Lactobacillus crispatus* inhibits growth of *Gardnerella vaginalis* and *Neisseria gonorrhoeae* on a porcine vaginal mucosa model. *BMC Microbiology.* BMC Microbiology. 2015; 15(1): 1–12.
24. Green E. Human Microbiome Project: An Update. The National Institute of Health. 1977;2317–2323.
25. Yamamoto T, Zhou X, Williams C, Hochwalt A & Forney L. Bacterial Populations in the Vaginas of Healthy Adolescent Women. *J Ped and Adol Gynecol.* 2009;22(1): 11–18.
26. Fettweis J, Brooks J, Serrano M, Sheth N, et al. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology.* 2014;160(Pt 10): 2272–2282.
27. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider M, et. al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *PNAS.* 2011; 108(suppl.1): 4680-87.

28. Boskey E, Telsch K, Whaley K, Moench T & Cone R. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun.* 1999; 67(10): 5170-5175.
29. Smith B, McAndrew T, Chen Z, Harari A, et. al. Cervical Microbiome Over 7 Years and a Comparison of Methodologies for Its Characterization. *PLoS ONE.* 2012; 7(7):e40425.
30. Wessels J, Lajoie J, Vitali D et. al. Association of high-risk sexual behavior with diversity of the vaginal microbiota and abundance of *Lactobacillus*. *PLoS ONE.* 2017;12(11): e0187612.
31. Anahtar M, Gootenberg D, Mitchel C & Kwon D. Cervicovaginal Microbiota and Reproductive Health: The Virtue of Simplicity. *Cell Host and Microbe.* 2018;23(2): 159–168.
32. Tamrakar R, Yamada T, Furuta I, et al. Association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC Infect Dis.* 2007; 7:128.
33. Wessels J, Lajoie J, Vitali D, et. al. Association of high-risk sexual behavior with diversity of the vaginal microbiota and abundance of *Lactobacillus*. *PLoS ONE.* 2017;12(11): 1–23.
34. Torres K, Bahena M, Madrid C, et. al. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J Clinical Oncology.* 2014; 5(4):753-63.
35. Oh H, Kim B, Seo S, Kong J, et al. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21(7): 674.e1-674.e9.
36. Audirac A, Torres K, Bahena M, et al. Cervical microbiome and cytokine profile at various stages of cervical cancer: A pilot study. *PLoS ONE.* 2016; 11(4): e0153274.
37. Mitra A, MacIntyre D, Lee Y, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep.* 2015; 5.
38. Piyathilake C, Ollberding N, Kumar R, Macaluso M, et. al. Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses. *Cancer Prev Res.* 2016; 9(5):357–366.
39. Yang X, Da M, Zhang W, Qi Q, et al. Role of *Lactobacillus* in cervical cancer. *Cancer Manag Res.* 2018; 10: 1219–1229.
40. Li X, Wang H, Du X, Yu W, et. al. Lactobacilli inhibit cervical cancer cell migration in vitro and reduce tumor burden in vivo through upregulation of E-cadherin. *Oncol Rep.* 2017; 38(3):1561–1568.

41. Espinosa L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular*. 2007;110034(11):517–540.
42. Kuczynski J, Lauber C, Walters W, Wegner L, et. al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet*. 2011; 13(1):47–58.
43. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. [Internet]. 02 octubre del 2019. Disponible en: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>.
44. Lee Y, Cho Y, Kim E, et. al. Identification of Lactic Acid Bacteria in Galchi-and Myeolchi-jeotgal by 16S rRNA Gene Secuencing, MALDI-TOF Mass Spectrometry, and PCR-DGGE. *J Microbiol Biotechnol* 2018; 28(7):1112-1121.
45. Byun R, Nadkarni M, Chour K, Martin F, et. al. Quantitative Analysis of Diverse *Lactobacillus* Species Present in Advanced Dental Caries. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):3128–36.
46. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids Symposium Series* 1999; 41: 95-98.
47. Altschul S, Gish W, Miller W, et. al. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol*. 1990; 215(3): 403-410.
48. Yoon H, Ha S, Kwon S, et. al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67(5): 613-1617.
49. Martín R, Soberón N, Vázquez F & Suárez J. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(3):160-7
50. World Medical Assembly. Declaration of Helsinki. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 1964.
51. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud. [Internet]. 02 de febrero del 2014. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>
52. StataCorp. 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: Stata Corp LP.
53. Mendtvelso F and Rodríguez M. Prueba Chi-cuadrado de independencia aplicada a tablas 2xN. *Rev. Médica Sanitas*. 2018; 21(2):92-95.

8. ANEXOS

8.1. Carta de envío del artículo

7/10/2020

Correo: Ninfa Ramirez - Outlook

Your submission JMM-D-20-00646 has been assigned to an Editor - [EMID:d571c8c02fbda286]

JMM <em@editorialmanager.com>

Vie 25/09/2020 11:20 AM

Para: Ninfa Ramirez-Durán <ninfard@hotmail.com>

Manuscript number: JMM-D-20-00646

Title: Lactobacillus spp. detected in cervicovaginal exudates of women with and without cervical cancer

Authors: Cristian Eduardo Guadarrama-Sanchez, B.Sc.; Gaudy Lizeth Manzanares-Leal, PhD; Jaime Coronel-Martinez, Msc; Pablo Moreno-Pérez, PhD; Lilia Patricia Bustamante-Montes, PhD; Horacio Sandoval-Trujillo, PhD; Ninfa Ramirez-Durán, PhD

Dear Dr. Ramirez-Durán,

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Medical Microbiology*.

Your manuscript has now been assigned to Direk Limmathurotsakul who will assess your article for *Journal of Medical Microbiology*.

For editorial status updates, please email jmm@microbiologysociety.org or use the email function via Editorial Manager.

Kind regards,

Editorial Office

Journal of Medical Microbiology

Microbiology Society | microbiologyresearch.org

Browse our [Collections](#) – peer reviewed content from across the Society's publishing platform on a range of hot topics and subject areas, including [Microbe Profiles](#) and [ICTV Virus Taxonomy Profiles](#) (www.microbiologyresearch.org/content/collections). Also, if you have five minutes, please help us shape the future of *Microbiology* with this very quick survey: www.surveymonkey.co.uk/r/Microbiology-journal.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. ([Remove my information/details](#)). Please contact the publication office if you have any questions.

8.2. Resumen del artículo

Introduction: in Mexico, Cervical Cancer (CC) is the second most common malignancy in women of reproductive age. In 2013 this disease had a mortality rate of 11.3 per 100 thousand women. Between the factors associated with the development of the CC, the persistent infection by the Human Papilloma Virus (HPV) is the main one. Studies focused on its etiopathogenesis suggest that Cervicovaginal Microbiota (CVM) dysbiosis is a factor involved in the installation and virulence of the HPV. In particular, the decrease or absence of species of the genus *Lactobacillus* leads to an increased susceptibility to diseases of the cervicovaginal tract.

Hypothesis: Women with CC have a different lactobacillary microbiota than women without CC.

Aim: the study aimed to detect and compare the presence of five *Lactobacillus* species in cervicovaginal exudates of Mexican women with and without CC.

Methodology: 128 samples of cervicovaginal exudate were distributed in two groups composed of women with and without CC. Metagenomic DNA was obtained from all samples, and its integrity, concentration, and purity were analyzed. Specific primers were used to detect by PCR the species: *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, and *L. jensenii*. The presence of the detected species was corroborated by sequencing and comparison with sequences deposited in the BLAST and EZ BioCloud databases.

Results: The five species targeted were present in the control group. In this group, a high percentage of *L. acidophilus* was found (95%). Four species of *Lactobacillus* were detected in the study group. *L. iners* was the most frequent species (97%).

Conclusions: It was demonstrated the presence of the five species of *Lactobacillus* evaluated in the cervicovaginal microbiota of Mexican women without CC. It was observed that in women with CC, there was a decrease in the diversity of *Lactobacillus* species.