



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD HOSPITAL DE
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA NO. 4
“LUIS CASTELAZO AYALA”**

***MICROBIOTA VAGINAL ASOCIADA A VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN
MUJERES CON Y SIN EMBARAZO.***

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA**

PRESENTA

DR. RICARDO ANDRÉS SOLÍS GARCÍA

ASESOR

DR. JUAN CARLOS MARTÍNEZ CHEQUER



CIUDAD DE MEXICO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Carta de aceptación del trabajo de tesis.

Por medio de la presente informamos que el Dr. Ricardo Andrés Solís García, residente de la especialidad de Ginecología y Obstetricia ha concluido la escritura de su tesis: Microbiota vaginal asociada a virus de papiloma humano en mujeres con y sin embarazo, la cual fue parte del estudio denominado "Identificación de los lactobacilos adheridos en el epitelio con cáncer cervicouterino" con número de registro R-2014-785-019, por lo que otorgamos autorización para su presentación y defensa de la misma.

Dr. Oscar Moreno Álvarez
Director General
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala"
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Juan Carlos Martínez Chequer
Asesor de tesis
Director de Educación e Investigación en Salud
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala"
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Sebastián Carranza Lira
Jefe de la División de Investigación en Salud
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala"
Instituto Mexicano del Seguro Social

Hoja de reconocimientos

Este proyecto de investigación fue realizado a partir del estudio denominado "Identificación de los lactobacilos adheridos en el epitelio con cáncer cervicouterino" el cual fue evaluado por el CNIC del IMSS, que otorgó el número de registro R-2014-785-019, y fue realizado por el Dr. Mauricio Salcedo Vargas, investigador titular D, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas- Hospital de Oncología, CMN SXXI-IMSS y el M. en C. Reynaldo Hernández Santiago, estudiante de Biomedicina y Biotecnología Molecular, ENCB-IPN, Laboratorio de Oncología Genómica, Hospital de Oncología, CMN SXXI-IMSS.

Agradecimientos

A mis padres, Rosa María y Jorge Ricardo, con mucho cariño. No son suficientes las palabras para agradecer, por su trabajo, sacrificio y paciencia demostrada en todos mis años de estudio, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Han sido el apoyo fundamental para lograr los objetivos propuestos, ya que, con su ejemplo y amor profundo, me encaminaron a seguir firme en mis propósitos. Es un orgullo y privilegio ser su hijo.

A mis hermanos, Jorge y Rocío Gabriela, y a mi sobrina, Rocío Samira, por estar siempre presentes, acompañándome y por el apoyo moral, que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

A mi asesor de tesis, el Dr. Martínez Chequer, por el apoyo brindado, que con su amplia experiencia y conocimientos me orientó al correcto desarrollo y culminación con éxito de este trabajo de investigación.

A todos mis maestros, que, durante mis años de residencia, con dedicación y paciencia, me enseñaron a ser mejor persona y mejor médico.

A mis amigos. Con todos los que compartí dentro y fuera del hospital. Aquellos personajes, que se convierten en amigos de vida y aquellos que serán mis colegas, gracias por todo su apoyo.

Todos en conjunto me hicieron ver, que sin importar cuanto tiempo me tome, todo se puede si de verdad se quiere.

Índice

Resumen	6
Abstract	7
Marco teórico	8
Objetivos	11
Hipótesis	12
Metodología	13
Resultados	16
Discusión	17
Conclusiones	19
Bibliografía	20
Anexos	22
Tablas	26
Gráficos	32

Microbiota vaginal asociada a Virus de Papiloma Humano.

Resumen

Introducción: Hasta el momento pocos estudios se han publicado sobre el microbioma cervical como un modificador de la infección por el virus del papiloma humano (VPH), particularmente en pacientes gestantes. Este estudio va dirigido a la valoración de la microbiota vaginal y su repercusión por la presencia o ausencia del VPH.

Objetivo general: Identificar la microbiota vaginal en presencia de virus de papiloma humano durante el embarazo y fuera de él.

Material y métodos: Se trata de un estudio observacional, prospectivo, transversal y comparativo, que se realizó en el período de julio 2020 a septiembre 2020 en la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” a las pacientes que acudieron a consulta externa de especialidad de ginecología y obstetricia de primera vez, tanto embarazadas como no embarazadas. Todas las pacientes que aceptaron participar en el estudio de investigación se les tomó una muestra cervicouterina mediante cepillado endocervical e hisopado durante la exploración física rutinaria. Se identificó el virus del papiloma humano a través de PCR y se cultivaron 4 microorganismos (staphylococcus, streptococcus, lactobacilos y cándida albicans) a través de DNA para los raspados y detección de microbiota. En este estudio se comparó la flora vaginal y su relación con el virus del papiloma humano además de la modificación de la misma en presencia o ausencia del virus, en pacientes gestantes y no gestantes. También se valoró la relación de este virus con agentes patógenos como streptococcus, staphylococcus y cándida. Los resultados se compararon a través de tablas de 2x2 y tablas comparativas cualitativas.

Resultados: Se encontró la presencia de microorganismos en el 52% de los casos, predominando en quienes tenían ausencia del virus del papiloma humano en el 46% y el 6% restante en presencia del virus del papiloma humano. Se encontró la presencia de lactobacilos en el 35% de todas las pacientes. Se identificó la presencia de microorganismos patógenos en el 42% de las mujeres embarazadas y en el 47% de las no embarazadas, la presencia del VPH no influyó en los microorganismos patógenos en ambos grupos. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron identificar la presencia del virus del papiloma humano en el 10% de los casos, mayoritariamente en el grupo de mujeres no embarazadas, en el cual el porcentaje de positividad para el VPH fue del 13%, mientras que en el grupo de mujeres embarazadas se observó en el 9% de los casos.

Conclusiones: La microbiota entre mujeres embarazadas y no embarazadas es semejante. La presencia del VPH en mujeres embarazadas y no embarazadas fue semejante. El virus del papiloma humano predominó en las mujeres embarazadas con menor edad.

Palabras clave: Microbiota, virus del papiloma humano, lactobacilos

Abstract

Introduction: To date, few studies have been published about the cervical microbiome as a modifier of human papillomavirus (HPV) infection, particularly in pregnant patients. This study is aimed at assessing the vaginal microbiota and its impact due to the presence or absence of HPV.

Objective: To identify the vaginal microbiome in the presence of human papillomavirus during and outside of pregnancy.

This is an observational, prospective, cross-sectional and comparative study, which was carried out in the period from July 2020 to September 2020 in the High Specialty Medical Unit Hospital of Gineco Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala" to the patients who attended first-time obstetrics and gynecology specialty outpatient clinic, both pregnant and non-pregnant. All patients who agreed to participate in this research study had a cervical swab taken by endocervical brushing and swabbing during routine physical examination. The human papillomavirus was identified through PCR and 4 microorganisms (staphylococcus, streptococcus, lactobacilli, and candida albicans) were cultured through DNA for scrapings and microbiome detection. In this study we compared the vaginal flora and its relationship with the human papilloma virus, as well as its modification in the presence or absence of the virus, in pregnant and non-pregnant patients. The relationship of this virus with pathogens such as streptococcus, staphylococcus and candida was also assessed. The results were compared through 2x2 tables and qualitative comparative tables.

Results: The presence of microorganisms was found in 52% of the cases, prevailing in those with the absence of the human papillomavirus in 46% and the remaining 6% in the presence of the human papillomavirus. Lactobacilli were found in 35% of all patients. The presence of pathogenic microorganisms was identified in 42% of pregnant women and 47% of non-pregnant women, the presence of HPV did not influence pathogenic microorganisms in both groups. The results obtained in this study allowed identifying the presence of the human papillomavirus in 10% of the cases, mainly in the group of non-pregnant women, in which the percentage of positivity for HPV was 13%, while in the group of pregnant women was observed in 9% of cases.

Conclusions: The microbiome between pregnant and non-pregnant women is similar. The presence of HPV in pregnant and non-pregnant women was similar. The human papillomavirus predominated in younger pregnant women.

Key words: Microbiome, human papillomavirus, lactobacilli.

Marco teórico

La cantidad de mujeres con infección de VPH es distinta entre diferentes poblaciones. Al comparar el porcentaje en 3 partes de once regiones (Nigeria, India, Vietnam, Tailandia, Corea, Colombia, Argentina, Chile, Holanda, Italia y España), usando PCR para VPH 15,613 pacientes entre los 15-74 años sin alteraciones en citología cervical, la prevalencia de VPH evaluada por edad difiere alrededor de veinte veces entre países, desde 1.4% en España a 25.6% en Nigeria.¹ Independientemente de que los casos de VPH como VPH 16 fueron mucho mas elevados en el África Subsahariana, las pacientes con PCR para VPH en la Unión Europea presentaron mas casos de VPH que en la región previamente mencionada, pero con menos afección por otros tipo de VPH de alto riesgo.^{1,2} Las pacientes sudamericanas tuvieron fueron moderadamente prevalentes entre los países europeos y africanos.³ El cáncer cervicouterino sigue siendo altamente prevalente en el mundo, con el 10% de los cánceres en mujeres (519,800 casos) y 7% (274,100) de las muertes por tumores malignos en pacientes del sexo femenino. En nuestro país, las estadísticas de tumores malignos en el 2016 demostraron una prevalencia de 24,094 casos de neoplasias malignas cervicales invasoras y 14,867 casos de carcinoma in situ. A diferencia de la situación en Norte América y la Unión Europea, que acorde a sus estadísticas el 75% de los casos son diagnosticados en etapas clínicas tempranas, en México los estadios localmente avanzados (IIB-IVa) son las que tienen mayor prevalencia, como sucede en otras regiones subdesarrolladas, dando por supuesto que el cribaje de Papanicolaou no está siendo lo suficientemente efectivo.¹ El microbioma se define como el agrupado de agentes microscópicos que habitan el cuerpo y realizando una comunicación cruzada con las células para mantener la homeostasis de todas las funciones fisiológicas. Puede tener impacto en la salud humana disminuyendo el crecimiento de patógenos, generando productos microbianos que favorecen las funciones y metabolizando nutrientes y toxinas.⁴ La microbiota considera como un factor ambiental al que estamos expuestos de manera continua y frecuentemente en toda la vida y es capaz de influir en el inicio de una patología maligna. Los genomas colectivos que están en un ecosistema microbiano único forman la microbiota. La inmunidad innata y adaptativa en el huésped está influenciada por la microbiota.^{2,5} En este aspecto en particular, estos gentes cumplen una función equilibrada con la función fisiológica humana, asegurando el que ambas partes se benefician. Sin embargo, en ocasiones este equilibrio se ve alterado ocasionando una alteración denominada disbiosis, donde se alteran las especies en un nicho específico y generan una serie de modificaciones que coinciden con el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Al momento, la interacción entre microbios, cáncer y el sistema inmune no está completamente definida.^{2,6} La infección de cérvix y vagina con virus de papiloma humano 16 o 18 podría provocar una alteración epitelial denominada lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG) que se considera antecesor del carcinoma invasor del cuello del útero, pero únicamente un 10% de pacientes con infección de virus de papiloma humano de alto riesgo tendrán una lesión intraepitelial.⁷ Las acciones que provocan efectos mecánicos, como baños vaginales o la actividad sexual y factores biológicos, como las infecciones vaginales o enfermedades venéreas modifican el ambiente la vagina y con conocidos actores en la persistencia de una infección por VPH. Se asocia una microbiota vaginal alterada con la infección

por VPH, y los microorganismos vaginales como el las características inmunitarias desempeñan un papel importante en la progresión de lesiones intraepiteliales. Por ende, factores agregados actúan en conjunto con el virus de papiloma humano de alto riesgo para modificar el riesgo de la génesis del CaCu. Actualmente, falta ahondar en investigación sobre la relación entre la microbiota vaginal y el desarrollo de CaCu.¹

Composición de la microbiota cervicovaginal en diferentes condiciones. 1,8	
Diagnóstico	Bacterias mas abundantes
Sin lesión cervical VPH negativo	L. iners, L. crispatus, L gasseri, L. Jensenii, streptococcus agalactiae, Gardnerella vaginalis, Prevotella Sneathia
Sin lesión cervical VPH positivo.	L iners, L crispatus, L. gasseri, gardnerella vaginalis, pseudomona oleovorans, fusobacterium Spp.
Lesiones escamosas intraepitelial cervical	Sneathia spp. fusubacterium spp. atopobium vaginae, Megasphaera elsdenii, shuttleworthia satelles, L. crispatus, L. iners, gardnerella vaginalis.
Cáncer cervicouterino.	Fusobacterium necrophorum, fusobacteria spp. sneatha spp, shuttleworthia spp. streptococcus agalactiae

Las partes de un virus se componen por una cápsula de proteínas, formada en un 94% por la proteína L1 y en un 6% por la L2, que de manera conjunta forman capsómeros hecosaédricos y que en determinado momento fueron usadas para la creación de inmunización.⁹ Dentro de la cápsula encontramos un DNA de doble cadena de 7000 pares de bases, caracterizado por ocho genes y una región no codificante, que presenta sitios de unión para proteínas y hormonas del huésped, imprescindibles para concluir la replicación viral. El VPH, está conformado por dos bases genómicas, los que son formados en las fases precoces, llamados genes E, y los codificados durante las fases tardías de la infección, llamados L. existen 6 genes tempranos: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y 2 tardíos: L1 y L2.^{10,11} Los tempranos generan material proteico encargado de la replicación y regulación viral, y su potencial cancerígeno, mientras que los genes tardíos generan material proteico que forma la cápsula del virus. Una porción viral de 4000 pares de bases hace la codificación de proteínas para la replicación del virus y la conversión celular; otra porción de 3000 pares de bases genera estructuras proteicas de los elementos del virus y por último una porción de 1000 pares de bases contiene los reguladores de la replicación y transcripción del ADN. ^{1,2} Podemos diferenciar los VPH entre sí basándonos en sus aminoácidos estructurales de la proteína mayor L1 de su cápsula, pues tienen niveles secuenciales superiores al 15%.⁵ Se dividen en cutáneos y mucosos. Los mucosos que se relacionan con alteraciones no malignas (6 y 11 en la mayoría de los casos) se conocen como de bajo riesgo y su entidad clínica la encontramos en los condilomas acuminados, y los tipos que se asocian a

alteraciones malignas (16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 y 52, en la mayoría de los casos) se conocen como de alto riesgo.^{1,12} Destacan los tipos 16 y 18 como los más importantes de alto riesgo de malignidad, ocasionando el 70 % de las neoplasias cervicales malignas mundialmente. Se ha demostrado en otras bibliografías a los tipos 56, 58 y 59, 68, 73 y 82, y los tipos 26, 53 y 66 como probablemente oncogénicos.³ El ciclo vital del VPH se relaciona a la proliferación y diferenciación de las células del huésped, iniciando su ciclo al infectar a las células indiferenciadas de las capas más superficiales epiteliales, iniciando la transcripción genética. La manera en que el virus llega las porciones celulares más inferiores epiteliales es por lesiones y soluciones de continuidad del epitelio. El VPH se pliega a la célula infectada por la molécula $\alpha 6$ -Integrina. Cuando sucede la infección, el VPH se hospeda en el núcleo de las células basales. El DNA se mantiene en estado episomal en la parte exterior cromosomal del huésped, y se replica a muy bajos niveles coordinados con la división celular.^{1,13} De manera genérica, se habla de que existe infección por VPH de uno a dos años posteriores a la relación sexual. Es bien sabido que la infección por el virus no es permanente, sin embargo, existen diversas situaciones que favorecen la persistencia, que pueden ser genéticos o adquiridos.¹⁴ El VPH tiene una alta transmisibilidad y en épocas actuales se conoce como la infección de transmisión sexual más común en el mundo. La gran mayoría de las pacientes portadoras del virus del papiloma humano se negativizan en dos años posteriores al contacto, las pacientes que persisten con el virus son altamente susceptibles de progresar a una neoplasia maligna del cérvix, aunque bien es conocido que la infección por VPH puede ser asintomática y no generar ningún daño. Lo más usual es que la competencia inmunitaria de la paciente evite que la infección progrese, y posteriormente tenga resolución espontánea, en diferentes tiempos, aunque no se ha determinado si la persistencia de la infección por VPH se caracteriza por una latencia viral donde el virus no es detectable y aparece nuevamente en etapas ulteriores de la vida o si existe detección continua el virus

Diferenciar entre una persistencia de infección o una transitoria es arbitrario y esto va a depender del tiempo de vigilancia en relación con la historia natural de la enfermedad y el tiempo entre muestreo. Se ha demostrado en diversos estudios que la recurrencia de VPH no es necesariamente un resurgimiento de un genotipo idéntico, sin embargo, es usual que se detecte otros tipos de VPH. Aun se debe indagar en estudios ulteriores sobre la competencia entre los tipos de virus, sin embargo, ha sido usual la relación entre infección por nuevas cepas de VPH en pacientes previamente infectadas por algún tipo del virus, comparadas con pacientes VPH negativas. Se debe investigar más a fondo la relación entre los microorganismos patógenos y la inmunosupresión en la génesis del CaCu.^{1,15}

Objetivos

Objetivo general

-Identificar la microbiota vaginal en presencia de virus de papiloma humano durante el embarazo y fuera de el.

Objetivos específicos

- Comparar las diferencias de la microbiota vaginal en presencia de virus de papiloma humano.
- Comparar las diferencias de la microbiota por efecto del embarazo.
- Comparar la microbiota vaginal en mujeres embarazadas con y sin VPH.
- Comparar la microbiota vaginal en mujeres no embarazadas con y sin VPH.

Hipótesis

Hipótesis alterna

- La microbiota vaginal es diferente con la presencia del virus de papiloma humano durante el embarazo y fuera de el.

Hipótesis nula

- No existe diferencia en la microbiota vaginal con la presencia de virus de papiloma humano independientemente del embarazo.

Metodología

El protocolo de investigación fue parte del proyecto denominado “Identificación de los lactobacilos adheridos en el epitelio con cáncer cervicouterino” el cual fue evaluado por el CNIC del IMSS, que otorgó el número de registro R-2014-785-019. El presente estudio se trató de un estudio observacional, prospectivo, transversal y comparativo, que se realizó en el período de Julio 2020 a Septiembre 2020 en la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” a las pacientes que acudieron a consulta externa de especialidad de ginecología y obstetricia de primera vez, tanto embarazadas como no embarazadas. Todas las pacientes que aceptaron participar en el estudio de investigación se les tomó una muestra cervicouterina durante la exploración física rutinaria.

Se extrajo el DNA de todos los raspados cervicales para la microbiota vaginal, bajo el siguiente protocolo:

1. Adicionar 400 μ L de buffer de lisis nuclear y vortexear.
2. Adicionar 30 μ L de proteinasa K.
3. Incubar a 60 °C en un termoblock por 24 horas.
4. Agregar 300 μ L de Acetato de amonio 5M a cada tubo.
5. Incubar a -20 °C por 30 min.
6. Centrifugar a 14000 rpm por 30 min.
7. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo. Y adicionar 600 μ L de isopropanol (frío). Incubar por 24 horas a -20 °C.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 15 min.
9. Decantar el sobrenadante (por pipeteo).
10. Adicionar 1000 μ L de etanol al 70% (frío).
11. Centrifugar a 7500 rpm por 5 min.
12. Decantar. Repetir los pasos 12 al 14 por 2 o 6 veces.
13. Colocar el tubo en el termoblock por 2 a 3 min.
14. Reconstituir con 30 μ L de agua libre de RNAsa.
15. Guardarlo a -20 °C.

Se extrajo el mRNA directamente de los raspados cervicales para detección de virus de papiloma humano, bajo el siguiente protocolo:

1. En un tupo Eppendorf de 1.5 mL, homogenizar la muestra con 1 mL de reactivo Trizol, y dejar incubar a -70°C.
2. Mezclar suavemente con la micropipeta.
3. Incubar la muestra homogenizada durante 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar 200 μ L de cloroformo.
5. Agitar fuertemente durante 15 segundos.
6. Incubar por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente y en posición vertical.
7. Centrifugar las muestras a 14 000 rpm por 10 minutos a una temperatura de 4 a 8°C.
8. Centrifugar la mezcla, para separar la muestra en dos fases, y tomar la fase acuosa en donde se encuentra el RNA.
9. Transferir la fase acuosa a otro tubo.
10. Adicionar 0.5 mL de isopropanol para precipitar el RNA de la fase acuosa.
11. Incubar el tubo por 10 minutos a temperatura ambiente y en posición vertical.

12. Centrifugar a 10 000 rpm o 12 000g por 10 minutos, a una temperatura de 2 a 8°C.
13. Remover el sobrenadante cuidadosamente y eliminarlo.
14. Adicionar 1 mL de etanol al 75% al pellet para lavarlo.
15. Mezclar por agitación.
16. Centrifugar a 6 000 rpm por 5 minutos a 2 o 8 °C.
17. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
18. Secar a temperatura ambiente, sobre una toalla de papel estéril.
19. Adicional 30 µL de agua libre de RNAsas.
20. Disolver el RNA por pipeteo suave, e incubarse a 10 minutos a 55 o 60°C, para lograr un completa disolución.

Todas las participantes dieron su consentimiento por escrito antes de ser incluidas. Los resultados obtenidos se analizaron a través de pruebas de estadística descriptiva mediante proporciones y porcentajes para cada grupo de estudio y pruebas de estadística comparativa mediante porcentajes y una prueba de comparación para variables cuantitativas entre grupos independientes.

Criterios de selección

- Criterios de inclusión.
 - Edad 15 a 70 años
 - Sin tratamiento antimicrobiano
- Criterios de exclusión: Falta de desarrollo bacteriano en cultivos
Falta de identificación del VPH
- Criterios de eliminación: Resultados incompletos

Tamaño de muestra y muestreo

Se utilizó la siguiente fórmula para pruebas diagnósticas

$$N = 4(Z\alpha)^2(pq)/IC^2$$

Zα= es la desviación normal estandarizada para el nivel de significancia establecido= 1.96

P= es la proporción esperada con los valores de sensibilidad y especificidad= 60%

q= es la deflexión de p= 1-0.97= 0.03.

IC²= es la amplitud máxima permitida en el intervalo de confianza alrededor del cual consideramos que sea el verdadero valor de sensibilidad y especificidad, en este caso = 0.1

$$N = 4(1.96)^2((0.60)(0.03))/0.01 = 48$$

Consideraciones éticas

Este protocolo fue diseñado con base a los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial Helsinki, Finlandia, Junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica

Mundial Tokio, Japón, Octubre de 1975. 35ª Asamblea Médica Mundial Venecia, Italia, Octubre de 1983. 41ª Asamblea Médica Mundial Hong Kong, Septiembre 1989, 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, Octubre 1996 y la 52ª Asamblea General Edimburgo, Escocia, Octubre 2000. Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002. Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004. Se tomó consentimiento informado por el tipo y características de la muestra.

Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo.

Carta de consentimiento informado

Por tratarse de un protocolo descriptivo, observacional y prospectivo en donde se tomó muestras vaginales a pacientes, fue necesario realizar carta de consentimiento informado (anexo II).

Recursos humanos

Investigadores responsables (principales):

Dr. Juan Carlos Martínez Chequer, Médico Ginecoobstetra, Director de Educación e Investigación en Salud.

Dr. Ricardo Andrés Solís García, residente de cuarto año de Ginecología y Obstetricia.

Actividad asignada: Supervisión, corrección, recolección de datos y análisis de datos, correcciones del informe final.

Número de horas por semana dedicadas a la investigación: 5 horas

Recursos materiales

- Expediente clínico
- Equipo de cómputo
- Equipo de oficina
- Hojas blancas
- Impresora

Recursos económicos

Quedó a cargo del investigador principal del proyecto eje

Factibilidad

Debido a que la unidad hospitalaria cuenta con una cantidad importante de pacientes, fue factible conseguir la muestra para el estudio.

Difusión de resultados

Tesis de especialidad médica.

Resultados

Al estudiar la microbiota en las mujeres embarazadas, se encontró la presencia de microorganismos en el 52% de los casos, predominando en quienes tenían ausencia del virus del papiloma humano en el 46% y el 6% restante en presencia del virus del papiloma humano. En referencia a las mujeres no embarazadas, se encontró la presencia de microorganismos en el 47% de los casos, predominando en quienes tuvieron ausencia del VPH con el 33%, de ellos y el 14% restante de los microorganismos se encontraron en las no embarazadas con VPH positivo. Al comparar la microbiota entre ambos grupos y al interior de cada uno de ellos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1).

Las mujeres embarazadas con presencia del virus del papiloma humano tuvieron una menor edad que las embarazadas sin virus del papiloma humano, mientras que la edad de las mujeres con presencia y ausencia del virus del papiloma humano fuera del embarazo no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Al comparar la edad de los 4 grupos de pacientes, considerando la presencia o ausencia del virus del papiloma humano presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.006$) (Tabla 2, gráfica 1).

Se encontró la presencia de lactobacilos en el 35% de todas las pacientes. En las embarazadas el porcentaje de presencia de lactobacilos fue del 36% y en las no embarazadas del 33%. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en las mujeres embarazadas ni en las no embarazadas. Al contrastar la presencia de lactobacilos con la presencia del VPH se encontró que los lactobacilos estuvieron ausentes en las embarazadas con la presencia del VPH, mientras que los lactobacilos fueron positivos en las no embarazadas con VPH, a pesar de ello, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la presencia o ausencia del virus del papiloma humano con la presencia o ausencia de lactobacilos entre las mujeres embarazadas y no embarazadas (Tabla 3).

Se identificó la presencia de microorganismos patógenos en el 42% de las mujeres embarazadas y en el 47% de las no embarazadas, la presencia del VPH no influyó en los microorganismos patógenos en ambos grupos. Al comparar la presencia de patógenos entre mujeres con y sin VPH, tanto embarazadas como sin embarazo, no existieron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4). En referencia a la presencia de *Candida albicans* en los grupos de estudio se encontró el 16% de este microorganismo, siendo semejante con el 8% para cada grupo de casos, identificando que el 12% tuvo la presencia de *Candida* en las mujeres embarazadas y el 27% en mujeres no embarazadas. Pese a esa amplia diferencia no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla 5).

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron identificar la presencia del virus del papiloma humano en el 10% de los casos, mayoritariamente en el grupo de mujeres no embarazadas, en el cual el porcentaje de positividad para el VPH fue del 13%, mientras que en el grupo de mujeres embarazadas se observó en el 9% de los casos. Al comparar la presencia del virus del papiloma humano entre ambos grupos no se encontró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

Discusión

En el presente estudio se encontró que la microbiota en mujeres embarazadas y no embarazadas con la presencia o ausencia del VPH no fue diferente. No obstante, el VPH se encontró mayormente en mujeres embarazadas menores de 27 años lo que representó una diferencia estadísticamente significativa con las mujeres no embarazadas en función de dicha edad. En el presente estudio, la microbiota consistió en la identificación de 4 agentes incluidos los lactobacilos, que en ninguno de los casos constituyen un agente patógeno, pese a que se ha descrito que su incremento puede estar asociado a la manifestación sintomática de quien presenta esta condición. Es de llamar la atención que los lactobacilos solo estuvieron presentes en un porcentaje mínimo de pacientes, lo que nos lleva a cuestionar sobre la participación que se les atribuye como agentes protectores de las defensas naturales de la cavidad vaginal en función de la disminución del pH, toda vez que de las 48 pacientes estudiadas solo en 3 de ellas se hicieron evidentes en forma pura. En contraste, la presencia de los lactobacilos combinados con alguno de los otros microorganismos se incrementó casi 5 veces, representando que una de cada 3 embarazadas tiene lactobacilos al igual que una paciente de cada 3 no embarazadas. Por lo anterior la condición de embarazo no modificó la presencia de lactobacilos, cuestionando este hallazgo la acción hormonal de la placenta para el incremento de los mismos.

Tampoco se hizo evidente la diferencia entre agentes patógenos, incluyendo el VPH, entre mujeres embarazadas y sin embarazo, lo que hace pensar que el embarazo no juega un papel predisponente ni protector contra la presencia de microorganismos patógenos. En referencia a la presencia de *Candida albicans*, aunque se encontró proporcionalmente una mayor presencia fuera del embarazo que dentro de él, en este estudio tampoco se corroboró que el embarazo sea una condición que favorezca su presencia como ha sido ampliamente señalado. La mayor presencia proporcionalmente de este patógeno en las mujeres no embarazadas de este estudio, podría representar una condición asociada con el estado hormonal dependiente de la etapa del ciclo, lamentablemente, no fue un dato que se consideró para la toma de los estudios, por lo cual, no se puede inferir alguna otra explicación.

La relación de la microbiota en la modulación del sistema inmune del tracto genital femenino es un aspecto que se ha estudiado recientemente, específicamente al evaluar los mecanismos que utilizan las bacterias para inducir inmunosupresión cervical en cáncer cervicouterino y el papel de la microbiota en la modulación del sistema inmune del tracto genital femenino, estos aspectos que continúan en estudio quizá puedan ofrecer una oportunidad para diseñar nuevas estrategias de diagnóstico con marcadores microbiológicos para la detección de las primeras etapas del cáncer cervicouterino, así como la capacidad de restablecer la homeostasis cervicovaginal con el uso de probióticos y con tratamiento antibiótico. La microbiota tiene un efecto importante en la formación y progresión del cáncer, e incluso puede influir en el resultado de la quimioterapia y la inmunoterapia. Aunque la mayoría de estas acciones están mediadas por efectos indirectos sobre la vigilancia inmunológica, también pueden implicar los efectos directos de los productos microbianos -como carcinógenos, agentes citotóxicos y metabolitos- en las células cancerosas. Algunas revisiones previas de inmunoterapia contra el cáncer sugieren el uso de modelos preclínicos óptimos de oncogénesis, progresión tumoral y respuestas

terapéuticas que deberían incluir la estandarización de la microbiota (en lugar del uso de ratones con microbiota variable). La "humanización" del ratón con cánceres y células inmunitarias heredadas del paciente se podría combinar con el trasplante de microbiota fecal para crear un modelo que reúna las células neoplásicas, el sistema inmune y la microbiota del paciente.¹⁰ El estudio de la microbiota y su relación con el cáncer se encuentra en etapas iniciales y aún queda mucho trabajo por hacer. La mayoría de los estudios realizados en pacientes han sido limitados, tanto en número como en diseño (tamaño y tipo de muestra, métodos de análisis e interpretación de los resultados). Se requiere la transición de un abordaje de estudio de la composición microbiana a uno enfocado en el estudio de las funciones de los microorganismos predominantes en cada nicho anatómico y el metaboloma, para comprender mejor el proceso de carcinogénesis basado en las interacciones complejas entre las respuestas inmunitarias del huésped con la microbiota y el efecto de los factores ambientales y genéticos sobre estas interacciones³. También es importante enfatizar el papel potencial que la microbiota tiene en la prevención del cáncer, actuando como un biomarcador temprano para identificar individuos con ciertos perfiles bacterianos que los predisponen a un riesgo más alto. Además, la microbiota podría potencialmente utilizarse como un factor modificable mediante el uso de probióticos y/o antibióticos, con el fin de prevenir la evolución del cáncer o potenciar el tratamiento del cáncer¹³.

Conclusiones

1. La microbiota entre mujeres embarazadas y no embarazadas fue semejante.
2. La presencia del VPH en mujeres embarazadas y no embarazadas fue semejante.
3. El virus del papiloma humano predominó en las mujeres embarazadas con menor edad.

Bibliografía

1. Martín R, Heilig GHJ, Zoetendal EG, Smidt H, Rodríguez JM. Diversity of the lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J Appl Microbiol*. 2015;103(6):2638-2644.
2. Martínez M, Castro G, Aguilera M. Lactobacillus species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study. *BMC Infect Dis*. 2013;13:189-189.
3. Vargas VM. La asociación de la microbiota, virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino. *Rev Hosp Jua Mex*. 2018;85(1):6-8.
4. Pendharkar S, Magopane T, Larsson P, Gray G, Hammarström L, Marcotte H. Identification and characterization of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Infect Dis*. 2015;26(13):43.
5. Vásquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G. Vaginal Lactobacillus Flora of Healthy Swedish Women. *J Clin Microbiol*. 2014;40(8):2746-2749.
6. Zitvogel L, Daillère R, Roberti MP, Routy B, Kroemer G. Anticancer effects of the microbiome and its products. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(8):465-478.
7. Thomas S, Izard J, Walsh E, Batich K, Chongsathidkiet P, Clarke G, Sela D. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Res*. 2017;77(8):1783-1812.
8. Vriend, H, Bogaards J, van Bergen J, Brink A, Van den Broek I, Hoebe C. Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young women with or without Chlamydia trachomatis co-infection. *Cancer Med* 2015; 4(10):1589-98.
- 9- Clarke M, Rodriguez AC, Gage JC, Herrero R, Hildesheim A, Wacholder S, Burk R. A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis*, 2012;12:33.
10. Gómez H, Lamadrid H, Cahuana L, Silverman O, Montero P, González MC, Fitzmaurice C, Pain A, Allen C, López A. La carga del cáncer en México. *Salud Publica Mex*. 2016;58:113-118.
- 11.- 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;13:271.
- 12.- Chase D, Goulder A, Zenhausern F, Monk B, Herbst M. The vaginal and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: A review of applications in etiology, symptoms and treatment. *Gynecol Oncol*. 2015;138:190–200.
- 13.- Audirac A, Torres K, Bahena M, Téllez J, Martínez J, Cortina B, Lóopez G, Delgado K, Burguette A, cantú D, García A, Madrid V. Cervical Microbiome and

Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. PLoS One. 2016;11(4):e0153274.

14.- Pevsner M, Tuganbaev T, Meijer M, Sheng Z, Zhi Z, Min C, Elinav E. Role of the microbiome in non-gastrointestinal cancers. World J Clin Oncol. 2016; 200:213.

15.- Dellaglio F, Torriani S, Felis GE. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004;54(3):809-812.

Anexo I. Cronograma de actividades

MES	Actividad
Julio 2020	Toma y procesamiento de muestras
Agosto 2020	Procesamiento de información
Septiembre 2020	Análisis estadístico. Elaboración de reporte de información en forma de tesis

**Anexo II. Carta de consentimiento informado
 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
 UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD. COORDINACIÓN DE
 INVESTIGACIÓN EN SALUD.**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN.

Nombre del estudio: Microbiota vaginal asociada a virus de papiloma humano en mujeres con y sin embarazo.

Patrocinador externo (si aplica): No aplica.

Lugar y fecha: Ciudad de México, a

Justificación y objetivo del estudio: El objetivo del estudio es conocer los microorganismos (bacterias) en parte inferior del útero (cuello uterino, o cuello de la matriz) y vagina asociados a infección por virus de papiloma humano en mujeres con y sin embarazo.

Procedimiento: Este estudio requiere la toma de muestra de cuello uterino para la detección de microorganismos predominantes y la detección de infección por virus de papiloma humano. La toma de muestra se realizará en los consultorios de consultas de primera vez (1, 2, 3 y 4), con presencia de personal de enfermería, el médico colocará el espejo vaginal para la visualización del cuello uterino realizando la toma de la muestra. Se le harán preguntas acerca de antecedentes personales y gineco obstétricos y quedará asentada su participación en el expediente. Los resultados de este protocolo de investigación serán usados únicamente en este estudio. Las muestras del cuello uterino serán enviadas a un laboratorio externo a esta unidad ubicado en Centro Médico Nacional Siglo XXI, donde se procesarán.

Posibles riesgos y molestias: Incomodidad al momento de la colocación de espejo vaginal. En caso excepcional infecciones vaginales.

Posibles beneficios que recibirá el paciente en el estudio: Detección de infecciones vaginales y de infección por virus de papiloma humano.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento: La información sobre los resultados de la toma de muestra del raspado del cuello del útero (como infecciones bacterianas o por virus de papiloma humano) le será otorgada en la consulta subsecuente. La atención y el tratamiento que amerite serán los mismos independientemente de su participación y estarán de acuerdo a los procedimientos establecidos en el IMSS. Privacidad y confidencialidad: Los datos personales que se obtengan en esta investigación son estrictamente confidenciales. Los datos quedarán resguardados por el investigador, garantizando la privacidad de los mismos.

Participación o retiro: Su participación en esta investigación es voluntaria. Usted puede decidir libremente si participa o no en la misma, y decidir retirarse en cualquier momento del proceso de investigación. Su retiro o no participación en el presente estudio de investigación no afectará la atención médica que recibirá en el Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 ni sus beneficios como derechohabiente IMSS.

En caso de colección de material biológico:

- No autoriza que se tome la muestra.
- Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.
- Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes: Acorde a resultados de la toma de muestra, se puede en siguientes consultas pautar un tratamiento específico y envío a diferentes servicios disponibles en este hospital.

Beneficios al término del estudio: Incrementar el conocimiento sobre los bacterias asociadas a infección por virus de papiloma humano.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse con:

Investigadores responsables:

Dr. Juan Carlos Martínez Chequer. Dirección de Educación en Salud, UMAE HGO No. 4 "Luis Castelazo Ayala" 6 piso, en horario de 8:00-14:00 hrs, Teléfono:5556 162942 Ext 28017

Colaboradores: Dr. Ricardo Andrés Solís García.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores, Ciudad de México, >CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Nombre y firma del paciente.

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento informado.

 Testigo 1

 Testigo 2

Anexo III. Declaración de autenticidad y no plagio



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA No.4
"LUIS CASTELAZO AYALA"**



Declaración de Autenticidad y No Plagio

Por el presente documento, yo Solís García Ricardo Andrés alumno de posgrado de la Especialidad en Ginecología y Obstetricia en la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco Obstetricia "Luis Castelazo Ayala", del IMSS.

Informo que he elaborado el Trabajo de Investigación, tema de tesis denominado "Microbiota vaginal asociada a virus de papiloma humano en mujeres con y sin embarazo" y declaro que:

- 1) En este trabajo no existe plagio de ninguna naturaleza y es de carácter original, siendo resultado de mi trabajo personal, el cual no he copiado de otro trabajo de investigación, ni utilizado ideas, fórmulas, ni citas completas "strictu sensu", así como ilustraciones diversas, obtenidas de cualquier tesis, obra, artículo, memoria, etc., (en versión digital o impresa).
- 2) Asimismo, dejo constancia de que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo, por lo que no se ha asumido como propias las ideas vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos como en Internet.
- 3) Asimismo, afirmo que soy responsable de todo su contenido y asumo, como autor, las consecuencias ante cualquier falta, error u omisión de referencias en el documento. Sé que este compromiso de autenticidad y no plagio puede tener connotaciones éticas y legales.

Por ello, en caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a lo dispuesto en la Normatividad que implique al programa.

Ricardo Andrés Solís García
NOMBRE COMPLETO DEL RESIDENTE

Ciudad de México, a 30 de septiembre de 2020

Anexo IV. Hoja de recolección de datos**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.****NÚMERO DE CASO:****EDAD:****ANTECEDENTES:****INICIO DE VIDA SEXUAL ACTIVA:****NÚMERO DE PAREJAS SEXUALES:****ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL:****TRATAMIENTOS PREVIOS OTORGADOS:****CITOLOGÍA CERVICAL:****DIAGNÓSTICO CLÍNICO:**

- EMBARAZO** _____
- SIN EMBARAZO** _____

MICROBIOTA Y/O PATÓGENO(S) ASOCIADO(S):

- PRESENCIA DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO**
- AUSENCIA DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO**

Tablas

Tabla 1. Microbiota en mujeres embarazadas y no embarazadas con y sin VPH

Microorganismos	Embarazadas (n=33)		No embarazadas (n=15)		Total	
	VPH positivo (n=3)	VPH negativo (n=30)	VPH positivo (n=2)	VPH negativo (n=13)	VPH +	VPH -
Staphylococcus	2	3	0	1	2	4
Cándida sp	0	0	0	0	0	0
Lactobacilos	0	3	0	0	3	0
Streptococcus	0	0	0	0	0	0
No desarrollo	1	15	0	8	1	23
Más de 1 agente	0	9	2	4	2	13
Valor P	NS		NS		0.5	

Tabla 2. Grupo etario de mujeres embarazadas y no embarazadas con y sin VPH

Edad	Embarazadas (n=33)		No embarazadas (n=15)		Total	
	VPH positivo (n=3)	VPH negativo (n=30)	VPH positivo (n=2)	VPH negativo (n=13)	VPH +	VPH -
> 27 años	3	16	1	10	4	26
≤27 años	0	14	1	3	1	17
Valor P	0.047		0.47		0.37	

Tabla 3. Presencia de lactobacilos en mujeres embarazadas y no embarazadas con y sin VPH

Lactobacilos	Embarazadas (n=33)		No embarazadas (n=15)		Total	
	VPH positivo (n=3)	VPH negativo (n=30)	VPH positivo (n=2)	VPH negativo (n=13)	VPH +	VPH -
Positivos	0	12	2	3	2	15
Negativos	3	18	0	10	3	28
Valor P	0.24		0.09		0.58	

Tabla 4. Presencia de patógenos en mujeres embarazadas y no embarazadas con y sin VPH

Patógenos	Embarazadas (n=33)		No embarazadas (n=15)		Total	
	VPH positivo (n=3)	VPH negativo (n=30)	VPH positivo (n=2)	VPH negativo (n=13)	VPH +	VPH -
Positivos	2	12	2	5	4	17
Negativos	1	18	0	8	1	26
Valor P	0.5		0.2		0.1	

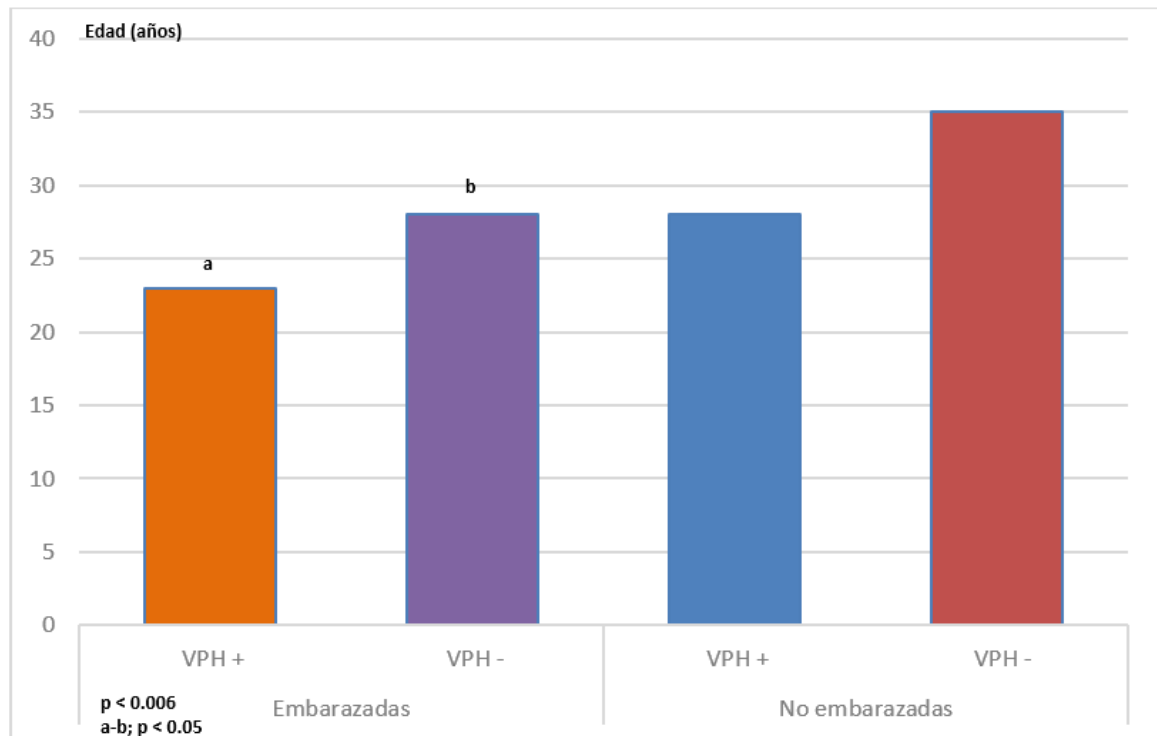
Tabla 5. Presencia de Cándida en mujeres embarazadas y no embarazadas con y sin VPH

Cándida	Embarazadas (n=33)		No embarazadas (n=15)		Total	
	VPH positivo (n=3)	VPH negativo (n=30)	VPH positivo (n=2)	VPH negativo (n=13)	VPH +	VPH -
Positivos	0	4	2	2	2	6
Negativos	3	26	2	11	5	37
Valor P	0.66		0.21		0.3	

Tabla 6. Presencia de VPH en mujeres embarazadas y no embarazadas

VPH	Embarazadas (n= 33)	No embarazadas (n= 15)
Positivo	3	2
Negativo	30	13
Valor P	0.5	

Gráficos



Gráfica 1. Edad de mujeres embarazadas y no embarazadas con y sin VPH