



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

“Asociación de genotipos del virus del papiloma humano con bacterias anaerobias vinculadas al desarrollo de neoplasia cervical en mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino”

TESIS

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

Presenta:

Marian José Hernández Ramón

Comité de Tutores

Directora: Dra. Ninfa Ramírez Durán

Co-directora: Dra. Gaudy Lizeth Manzanares Leal

Asesor: Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo

INDICE

Resumen	4
Abstract	6
1. Marco teórico	8
1.1 Cáncer cervicouterino	8
1.2 Virus del papiloma humano (VPH)	8
1.3 Microbiota cervicovaginal	10
1.4 <i>Gardnerella vaginalis</i>	11
1.5 <i>Atopobium vaginae</i>	12
1.6 <i>Sneathia</i> spp.....	13
1.7 <i>Fusobacterium</i> spp	14
1.8 Métodos moleculares para genotipificación, detección e identificación de virus y bacterias.....	14
2. Planteamiento del Problema.....	16
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos	20
6. Metodología	21
6.1 Diseño de Estudio.....	21
6.2 Descripción del origen de las muestras	21
6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	21
6.4 Procedimientos	22
6.4.1 Análisis de la concentración, pureza y calidad del ADN	22
6.4.2 Conformación de los grupos	22
6.4.3. Detección del oncogen E6-E7 del virus del papiloma humano por PCR.....	23
6.4.4 Detección de los genotipos del virus del papiloma humano por PCR multiplex	23
6.4.5 Detección de bacterias anaerobias por PCR.....	25
6.4.6 Identificación genética bacteriana	26
6.4.7 Análisis comparativo.....	26
6.5 Variables de Estudio.....	27
6.6 Operacionalización de variables.....	28
6.7 Implicaciones Bioéticas.....	29
6.8 Recolección de Datos	29
6.9 Análisis Estadísticos.....	29
7. Resultados	30
7.1 Carta de envío del artículo	30
7.2 Resumen del artículo	31
8. Discusión.....	33

9. Conclusiones	34
10. Referencias Bibliográficas	35

Resumen

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una proliferación de células malignas a nivel del útero que representa un problema de salud pública en México, siendo la segunda causa de mortalidad en féminas.

El CaCu requiere de distintos factores para su desarrollo, como la presencia del genotipo de alto riesgo del virus del papiloma humano (hrVPH), que debido a sus oncoproteínas E6 y E7, promueve la proliferación de células malignas, generando estadios de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) antes de establecerse el cáncer cervicouterino.

La microbiota cervicovaginal cumple con un papel importante para la persistencia del VPH. La disbiosis cervicovaginal, caracterizada por la disminución de *Lactobacillus* y un aumento de bacterias anaerobias como *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Sneathia* spp y *Fusobacterium* spp, puede formar un ambiente ideal para la infección por patógenos, como el VPH. Existen estudios que relacionan la disbiosis cervicovaginal con la persistencia del virus del papiloma humano, pero la evidencia actual entre la asociación de las bacterias anaerobias mencionadas anteriormente con los genotipos de alto riesgo es escasa.

Objetivo: Determinar la asociación entre los genotipos del virus del papiloma humano con bacterias anaerobias vinculadas al desarrollo de neoplasia cervical en mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino.

Método: Se incluyeron 60 muestras de ADN metagenómico obtenido a partir de exudados cervicovaginales de mujeres con cáncer cervicouterino adscritas al Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y sus acompañantes sin la enfermedad. Las muestras se dividieron en dos grupos: muestras de mujeres con diagnóstico positivo de CaCu (n=30) y muestras de mujeres con diagnóstico negativo de CaCu (n=30). Se analizó la calidad, pureza y concentración del ADN. Posteriormente se detectaron los genotipos de VPH mediante PCR multiplex anidada. La detección de *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Sneathia* spp y *Fusobacterium* spp se realizó con cebadores específicos por PCR. El análisis estadístico se hizo con X^2 y Prueba exacta de Fisher para la comparación de variables categóricas, y regresión logística para la asociación entre las variables.

Resultados: Se encontró que los genotipos 16 y 18 en combinación fueron los más frecuentes en el grupo de estudio, mientras que en el grupo control, solo el 13.33% presentó alguno de ellos. *Atopobium vaginae* estuvo en mayor frecuencia en el grupo control, mientras que la presencia de *Gardnerella vaginalis*, *Sneathia* spp y *Fusobacterium* spp fue mayor en el grupo de estudio. Se detectaron diferencias significativas entre las 4 bacterias anaerobias y los

genotipos 16 y 18, pero solo se asoció a *Sneathia* spp y *Fusobacterium* spp con la presencia de estos tipos virales.

Conclusión: Existe un predominio de los tipos virales de mayor riesgo del VPH en nuestra población, por lo que es importante la detección oportuna con pruebas de cribado. La detección de las 4 bacterias anaerobias de estudio en las muestras nos permitió conocer algunos de los componentes de la microbiota saludable y durante un proceso neoplásico, sin embargo, la asociación de *Sneathia* spp y *Fusobacterium* spp con los genotipos 16 y 18 nos indicó la posible participación de ambas en la adquisición del virus del papiloma humano, por lo que se pueden considerar como factores importantes en la infección por este virus.

Abstract

Cervical cancer (CaCu) is a proliferation of malignant cells at the level of the uterus that represents a public health problem in Mexico, being the second cause of mortality in women.

CaCu requires different factors for its development, such as the presence of the high-risk genotype of the human papillomavirus (hrHPV), which, due to its oncoproteins E6 and E7, promotes the proliferation of malignant cells, generating stages of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) before cervical cancer is established.

The cervicovaginal microbiota plays an important role in HPV persistence. Cervicovaginal dysbiosis, characterized by a decrease in *Lactobacillus* and an increase in anaerobic bacteria such as *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Sneathia* spp and *Fusobacterium* spp, can form an ideal environment for infection by pathogens such as HPV. There are studies linking cervicovaginal dysbiosis with human papillomavirus persistence, but current evidence between the association of the above-mentioned strict anaerobic bacteria with high-risk genotypes is scarce.

Objective: To determine the association between human papillomavirus genotypes with anaerobic bacteria linked to the development of cervical neoplasia in Mexican women with and without cervical cancer.

Methods: We included 60 metagenomic DNA samples obtained from cervicovaginal exudates of women with cervical cancer assigned the Instituto Nacional de Cancerología (INCan) and their companions without the disease. The samples were divided into two groups: samples from women with a positive diagnosis of CaCu (n=30) and samples from women with a negative diagnosis of CaCu (n=30). DNA quality, purity and concentration were analyzed. Subsequently, HPV genotypes were detected by nested multiplex PCR. Detection of *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Sneathia* spp and *Fusobacterium* spp was performed with specific primers by PCR. Statistical analysis was performed with X^2 and Fisher's exact test for the comparison of categorical variables, and logistic regression for the association between variables.

Results: It was found that genotypes 16 and 18 in combination were found to be the most frequent in the study population, while in the control group, only 13.33% presented any of them. *Atopobium vaginae* was more frequent in the control group, while the presence of *Gardnerella vaginalis*, *Sneathia* spp and *Fusobacterium* spp was higher in the study group. Significant differences were detected between the 4 anaerobic bacteria and genotypes 16 and 18, but only *Sneathia* spp and *Fusobacterium* spp were associated with the presence of these viral types.

Conclusion: There is a predominance of the highest risk viral types of HPV in our population, highlighting the importance of timely detection with screening tests. The detection of the 4

anaerobic bacteria of study in the samples allowed us to know some of the components of the healthy microbiota and during a neoplastic process, however, the association of *Sneathia* spp and *Fusobacterium* spp with genotypes 16 and 18 indicate the possible participation of both in the acquisition of the human papillomavirus, so they can be considered as important factors in the infection by this virus.

1. Marco teórico

1.1 Cáncer cervicouterino

Se denomina “cáncer” a aquellas enfermedades que presentan una proliferación descontrolada de células malignas que en algunos casos pueden migrar a distintos órganos por metástasis y dar lugar a cuadros clínicos severos, desencadenando la muerte (1). Es considerada una de las enfermedades con mayor letalidad a nivel mundial, presentando cifras de millones de casos y miles de muertes por año, incluso con pronósticos de aumento (1, 2).

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una enfermedad que invade la zona inferior del útero y causa lesiones (3), las cuales pueden ser detectadas por medios citológicos, como el Papanicolaou, que es una de las pruebas de cribado más comunes para su detección (4). Se estratifica por estadios, del 0 al 4, considerando aspectos como su capacidad invasiva y el tamaño del tumor, siendo la fase 4 el cuadro más severo (5).

Representa una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial. En México es la segunda causa de defunción en féminas (6). Se encuentra con mayor prevalencia dentro de países en vías de desarrollo, donde los métodos de prevención y pruebas de cribado son adecuados, pero no siempre se encuentran disponibles para toda la población (7), resultando en tasas de mortalidad y morbilidad altas. En 2020, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 3.1% del total de casos diagnosticados con cáncer, fueron de CaCu, mientras que, del total de fallecimientos por esta misma enfermedad, 3.3% correspondió a cáncer cervicouterino (8).

Para que la enfermedad se desarrolle, necesita de factores predisponentes como aspectos relacionados a la vida sexual, edad, métodos anticonceptivos utilizados, hábitos diarios como el tabaquismo e incluso la dieta (9). Pero el elemento fundamental para el progreso de la misma es la presencia del virus del papiloma humano (VPH). Este virus es causante de dicha enfermedad en el 99.8% de los casos (7,10), incluso Hatta y cols. en 2021 proponen factores en específico para que el VPH pueda desarrollar dicha neoplasia, como la persistencia de la infección, incidencia de agentes que favorezcan su presencia e inmunosupresión (11).

1.2 Virus del papiloma humano (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH) forma parte de la familia *Papillomaviridae*; ingresa a través de pequeñas heridas y genera lesiones en células basales del epitelio escamoso, funcionando como “maquinaria” para la replicación de este (12). Se transmite de forma sexual y en el 90% de las mujeres que lo albergan, desaparece de manera espontánea. Cuando el VPH persiste en el tracto cervicovaginal se ha encontrado al genotipo de alto riesgo (hrVPH) (13). Actualmente existen 200 genotipos de este virus (9), siendo 13 de ellos los de tipo oncogénico: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 (14). Los genotipos 16 y 18 se encuentran en el 70% de los casos de cáncer cervicouterino, considerándose los principales causantes de dicha neoplasia. Existen otros dos grupos de genotipos de mediano y bajo riesgo, en los que se encuentran el 6 y 11, principales causantes de las verrugas (15).

Los genotipos de alto riesgo son oncogénicos debido a la presencia de las proteínas E6 y E7 que alteran distintos mecanismos del cuerpo, como el aumento de la actividad de la telomerasa (8). Estudios genéticos indican que E6 impide la supresión tumoral de p53, inhibiendo la apoptosis del virus. E7 por su parte, inhibe al supresor tumoral retinoblastoma, estimulando la proliferación del virus. Uno de los principales factores para el desarrollo hacia cáncer es la integración del ADN (ácido desoxirribonucleico) viral con el genoma humano, estimulado por los genotipos de alto riesgo (16, 17).

La infección por virus del papiloma humano es asintomática al principio de su patogenia, incluso hay un lapso de hasta 2 años para que pueda ser eliminado de forma espontánea (ocurre con frecuencia en genotipos de mediano a bajo riesgo). La persistencia del virus genera un estadio conocido como neoplasia intraepitelial cervical (CIN), que también transcurre por fases antes del desarrollo hacia cáncer: CIN1, CIN2 y CIN3, siendo CIN3 el de alto grado (18).

Cada genotipo puede encontrarse en las distintas etapas de neoplasia, siendo los oncogénicos los que causan las lesiones (19). Si el genotipo hallado es de alto riesgo, tarda 1 año en generar lesiones pre-neoplásicas (20); pero si este persiste, puede originar que la paciente sea susceptible a infecciones por otros genotipos, incluso causar daño constante hasta el estadio de CIN3 durante un lapso de 30 años (18, 21).

Estudios realizados en México también describen otros genotipos de alto riesgo en muestras de mujeres con cáncer cervicouterino, como los genotipos 51 y 58. Cierta porcentaje de las pacientes han presentado una infección múltiple por estos genotipos. Los hallazgos publicados

hasta el momento muestran la importancia de estudiar las infecciones por el virus y su capacidad oncogénica, tomando en cuenta cada región geográfica y no solo de manera globalizada (22, 23). Para que el VPH persista, se requiere de distintos factores, entre ellos se encuentra la disbiosis de la microbiota cervicovaginal.

1.3 Microbiota cervicovaginal

Diversas regiones del cuerpo se encuentran habitadas por bacterias que forman parte de la microbiota habitual; estos microorganismos, junto a elementos anatómicos e inmunológicos, componen una barrera que protege al ser humano de diversas infecciones, manteniendo un equilibrio (24, 25).

La zona cervicovaginal no es la excepción; su microbiota está compuesta mayormente por *Lactobacillus*. Los *Lactobacillus* son bacterias Gram positivas, formadoras de ácido láctico y peróxido de hidrógeno, que mantienen el pH vaginal acidificado. Existen además, bacterias anaerobias predominantes que forman parte de este microbioma; su sinergia con los *Lactobacillus* y la mucosa presente, crean un ambiente inapropiado para diversos patógenos (26). La presencia de *Lactobacillus* es primordial en la zona cervicovaginal. Yang y cols. en 2018 propusieron el uso de estos microorganismos para establecer vacunas que protejan a dicho ecosistema de infecciones (27).

De acuerdo con Ravel y cols. (24), la microbiota no es universal, ya que existen factores, como la etnia, que causan diferencias entre las comunidades de microorganismos de las mujeres, incluso siendo sanas (28). La disbiosis cervicovaginal se origina por un desequilibrio entre los *Lactobacillus* y las bacterias anaerobias presentes, disminuyendo la cantidad de *Lactobacillus* y aumentando la del resto. De esta manera se crea un ambiente ideal para la colonización de diversos patógenos. Derivado de ello puede presentarse la vaginosis bacteriana (VB), caracterizada por la predominancia de bacterias anaerobias, aumento en el pH, flujo vaginal abundante y olor característico (29). Este tipo de cambios están causados por diversos factores endógenos (ciclo menstrual, edad, métodos anticonceptivos) que comprometen a las mujeres ante factores externos (26).

En el estudio de Ravel y cols. en 2011 (24), la población analizada fue clasificada en 5 grupos; en 4 de ellos dominaba el género *Lactobacillus*, mientras que en uno predominaban bacterias anaerobias. Entre las principales encontraron a *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*,

Sneathia spp y *Fusobacterium* spp. Una característica importante dentro de este grupo es que prevaleció en mujeres hispanas.

Por su parte, Laniewski y cols. en 2018, encontraron que la presencia de estas bacterias en mayor cantidad que los *Lactobacillus*, así como su persistencia, está asociada a la presencia del virus del papiloma humano, generando los estadios de neoplasia intraepitelial cervical hasta cáncer (30). Algunos investigadores como Liang y cols. en 2019, propusieron la asociación entre la vaginosis bacteriana y las infecciones por dicho virus (25), incluso la diversidad bacteriana ha sido mayor en los procesos neoplásicos de alto grado que en grupos de mujeres control (31, 32). En México se tiene registro de la asociación de bacterias anaerobias con los estadios de neoplasia intraepitelial cervical y cáncer, pero ninguno incluye a las cuatro bacterias tomadas en este estudio: *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Sneathia* spp y *Fusobacterium* spp (23).

Estos datos muestran la importancia del equilibrio de la microbiota cervicovaginal, el conocimiento de la disbiosis y su relación con los procesos neoplásicos. De esta forma puede contribuir al establecimiento de investigaciones dirigidas a detectar biomarcadores y a prevenir el desarrollo de la enfermedad con base en los factores propios del lugar de investigación (33, 34).

1.4 *Gardnerella vaginalis*

Es una bacteria anaerobia Gram variable (35) que predomina en el área cervicovaginal (36). Forma parte de la microbiota comensal (24) y es capaz de formar un *biofilm* que puede actuar como factor de colonización para otras bacterias, como *Atopobium vaginae*. De esta manera, llega a desplazar a los *Lactobacillus*, generando vaginosis bacteriana (37).

Además de pertenecer a la microbiota cervicovaginal comensal, es la bacteria con mayor asociación a vaginosis bacteriana (26), es por ello que su papel puede ser confuso, ya que está presente tanto en mujeres sanas como con infección (38). Debido a esto, se han realizado estudios que identifican a *Gardnerella vaginalis* con base en su proporción, presentándose mayormente en las mujeres que cursan con vaginosis bacteriana (36), o por cepas, distinguiendo aquellas que forman parte del microbioma comensal y las que causan patogenicidad (39).

El proceso de vaginosis bacteriana predispone a las mujeres para contraer infección cervicovaginal, entre ellas la que genera el virus del papiloma humano. *Gardnerella vaginalis* se ha identificado en mujeres sanas, con diagnóstico positivo de VPH y en lesiones precursoras neoplásicas (26). También se ha relacionado su presencia intermitente con el progreso hacia una neoplasia intraepitelial cervical, mientras que una mayor proporción de la misma ha sido asociada a la eliminación tardía del virus (40). Otros han considerado que *Gardnerella vaginalis* no actúa sola al inducir un proceso de vaginosis, sino que actúa en sinergia con otras bacterias presentes en el microbioma (41).

Janulaitiene y cols. en 2017 (38), proponen no descartar a *Gardnerella vaginalis* como agente causal de vaginosis bacteriana, ya que, a pesar de formar parte de la microbiota cervicovaginal, puede actuar con otras bacterias y así generar procesos infecciosos dependiendo de los grupos bacterianos que predominen.

1.5 *Atopobium vaginae*

Esta bacteria es Gram positiva, anaerobia estricta, que forma pares o cadenas (37). Es parte de la microbiota cervicovaginal normal (24), pero también es una de las bacterias predominantes en la vaginosis bacteriana junto con *Gardnerella vaginalis* (26).

Su presencia ha sido objeto de estudio de muchas investigaciones debido a su sinergia con *Gardnerella vaginalis*. Está demostrado que es una de las primeras bacterias que colonizan el epitelio después de la formación del *biofilm* por parte de *Gardnerella vaginalis*. *Atopobium vaginae* no es capaz de hacerlo sin ella. Algunos investigadores han propuesto a *Atopobium vaginae* como elemento importante para que *Gardnerella vaginalis* continúe con sus mecanismos de patogenia (42). El *biofilm* por ambas bacterias es propósito de estudio ante la resistencia a antibióticos (43).

Al ser protagonista en la vaginosis bacteriana, se ha visto asociada a la infección generada por el virus del papiloma humano, neoplasia intraepitelial cervical y cáncer cervicouterino, así como a una lenta remisión del virus cuando los *Lactobacillus* están en bajas proporciones (44). De igual forma se ha considerado un marcador importante para la persistencia del virus (45, 46). También está presente en porcentajes altos de personas sanas, con el virus del papiloma humano y lesiones pre-cancerosas (26, 32). Se ha señalado como una bacteria que se encuentra en los estadios de neoplasia intraepitelial cervical 2 y 3, hasta el desarrollo de cáncer. Debido a

ello, puede considerarse como un marcador importante para el desarrollo hacia neoplasia, aunque otros la han considerado como bacteria prevalente en los estadios tempranos de lesiones cancerosas (46).

1.6 *Sneathia* spp

Bacteria que forma parte del grupo de microorganismos Gram negativos, con morfología típica de bacilo, anaerobia estricta. Se encuentra en la microbiota cervicovaginal habitual, pero en recientes estudios ha sido asociada como marcador para predecir abortos prematuros (47). Existen 2 especies que pueden actuar en esta situación: *Sneathia amnii* y *Sneathia sanguinegens* (24, 48). Con *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae* forman parte de la vaginosis bacteriana (37).

Por ser una bacteria que se encuentra de manera habitual en tracto cervicovaginal, se ha buscado alguna asociación con la infección causada por el virus del papiloma humano. En algunos estudios se le ha relacionado con la colonización posterior a la formación del *biofilm* por parte de *Gardnerella vaginalis*, siendo parte importante en su generación (49). Otros estudios señalan que *Sneathia* spp es primordial para la presencia del virus del papiloma humano (30, 40, 50), ya que puede haber una asociación directa, indistintamente de los genotipos (46). De igual forma, se le ha relacionado con estadios tempranos en la neoplasia intraepitelial cervical (32) y ante una baja concentración de *Lactobacillus* (51).

La importancia de esta bacteria es que, no solo se ha encontrado en pacientes con infección por el virus del papiloma humano, sino que su presencia ha estado asociada mayormente a los estadios de neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (CIN3) y al cáncer cervicouterino. Se ha mencionado que su presencia es elevada en todos los estadios de neoplasia intraepitelial cervical, considerándolo así un marcador para dicho proceso (30, 40). Otros estudios han encontrado una baja concentración de la misma conforme aumenta el grado de la neoplasia (52).

De igual forma se ha asociado su presencia con el cáncer cervicouterino (53), considerándolo así un probable marcador que ayude a conocer si se puede llevar a cabo el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical hacia cáncer (54). Otro hallazgo importante es que, a pesar de la diversidad en la microbiota cervicovaginal, no se ha visto antagonismo ni potenciación entre ellos, si no que actúan de forma individual, estando en los estadios de CIN3 y cáncer (55).

1.7 *Fusobacterium* spp

Fusobacterium spp es un bacilo Gram negativo, anaerobio estricto (56). De acuerdo con Ravel y cols. (24), forma parte de la microbiota cervicovaginal, aunque no predominó en los 5 grupos de estudio del mismo. La importancia de este microorganismo radica en que es posible encontrarlo asociado a distintos tipos de cáncer (57). Su mayor asociación es con el cáncer colorectal (11), pues se ha visto que puede intervenir para su desarrollo (58). Algunos autores la han denominado como una “bacteria oncogénica” (59).

No existen muchos estudios que asocien a *Fusobacterium* spp con cáncer cervicouterino, solo se ha encontrado en conjunto con otras bacterias. Carrillo y cols. en 2021 la hallaron en pacientes con diagnóstico positivo para el virus del papiloma humano de alto riesgo (45). Otros han asociado su presencia en estadios tardíos de neoplasia intraepitelial cervical (CIN2 y CIN3) (33), aunque la mayoría notifican que su presencia se encuentra asociada a los cuadros de cáncer cervicouterino (32, 44, 54).

La especie de *Fusobacterium* spp más estudiada y relacionada con casos neoplásicos es *Fusobacterium nucleatum* (33), que puede actuar de forma proporcional con el proceso neoplásico, considerándolo así un marcador de la enfermedad; por lo que, entre más grave sea el cuadro clínico, mayor proporción de la bacteria habrá (55, 60).

1.8 Métodos moleculares para genotipificación, detección e identificación de virus y bacterias

Las pruebas usadas en el laboratorio clínico son importantes para dar un buen diagnóstico, y como cualquiera, tiene ciertas limitantes. Los métodos moleculares han cubierto dichas limitantes debido a su alta sensibilidad y especificidad. Lo más importante es que sus resultados se basan en hallazgos contenidos en el genoma (61).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido un método que desde su creación ha optimizado y ayudado al área clínica para tener mejores resultados. Su fundamento radica en la amplificación de un gen específico, multiplicándolo y generando una gran cantidad de copias de este, simulando así lo que sucede en el proceso de replicación del ADN *in vivo* (62). Es un método que ha ayudado a distintas áreas médicas y de investigación, entre ellas la virológica y bacteriana (63), como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Detección de virus y bacterias por la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Muestra	Microorganismo detectado	Técnica empleada	Fuente
Semen	Virus del papiloma humano	PCR de punto final	(64)
	<i>Chlamydia trachomatis</i>		
Tejido y materia fecal	<i>Echinococcus granulosus</i>	PCR múltiplex	(65)
	<i>Echinococcus multilocularis</i>		
	<i>Echinococcus canadensis</i>		
Agua	<i>Escherichia coli</i>	PCR de punto final	(66)
	<i>Salmonella sp</i>		
	<i>Vibrio cholerae</i>		
Muestras nasofaríngeas y de garganta	SARS-CoV-2	PCR en tiempo real	(67)

La PCR tiene diversas ventajas, entre ellas el tiempo en el que se detecta algún microorganismo, tiene alta sensibilidad y es fácil de realizar, por ello se propone como un método de diagnóstico (68). Con el paso de los años se han creado versiones modificadas del método tomando en cuenta aspectos ajenos al mismo, como los tipos de muestra que se analizarían, el manejo de estas y la presencia en bajas concentraciones de los microorganismos a detectar (62, 69, 70). La PCR multiplex es un ejemplo de dicha variante; se caracteriza por usar distintos cebadores al mismo tiempo para la amplificación de diversos genes (71).

El área oncológica, en especial la que trata el cáncer cervicouterino, ha sido una de las más beneficiadas con este método, ya que la detección temprana del virus del papiloma humano, incluso en proporciones menores, y su genotipificación con cebadores específicos para cada genotipo, ha contribuido para prevenir un desarrollo neoplásico (71, 72). De igual forma, el área de bacteriología ha podido optimizar sus tiempos para obtener resultados que antes se tardaban en generar por los métodos clásicos; un ejemplo es la identificación de ellas por medio de la secuenciación del gen 16SrRNA (73).

La importancia de este método es que tiene una base de detección genética, siendo más precisa y con resultados en un tiempo óptimo, por lo que podrá detectar a los genotipos 16 y 18 y a las bacterias asociadas a la presencia de dicho virus, incluso en bajas concentraciones o en infecciones tempranas (63, 74).

2. Planteamiento del Problema

El cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud en países en desarrollo. Es el cuarto cáncer más común en mujeres y la segunda causa de muerte en mujeres por neoplasia a nivel mundial. Solo en México cada año se registran 10000 casos y la mitad fallecen. Dichos datos son indicadores de que, incluso con las pruebas de cribado establecidas por la ONU y las vacunas contra el virus, no ha sido suficiente para disminuir la morbilidad y la mortalidad. El virus del papiloma humano (VPH) es su principal causante. Aunque mayormente, desaparece de manera espontánea, existen casos donde persiste en el tracto cervicovaginal. La persistencia genera lesiones neoplásicas y trasciende hasta cáncer, siendo los genotipos 16 y 18 la causa de la enfermedad en un 70%.

Se ha observado que la composición de la microbiota cervicovaginal puede ser un factor importante para la prevalencia del virus. La infección persistente por el VPH está relacionada con un desequilibrio debido a la reducción de *Lactobacillus*, bacterias productoras de ácido láctico. Esta pérdida promueve la colonización por especies de bacterias anaerobias con un aumento de la diversidad microbiana y del riesgo de enfermedad cervicovaginal. La enfermedad finalmente produce inflamación cervical y vaginosis bacteriana, contribuyendo en la progresión de las infecciones por VPH a lesiones cervicales de alto grado.

Entre las principales bacterias anaerobias asociadas significativamente con el riesgo de neoplasia intraepitelial cervical y cáncer cervicouterino se encuentran *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Sneathia* spp. y *Fusobacterium* spp., sin embargo, aún se desconoce su asociación con los distintos genotipos de VPH. Por el momento no existen reportes acerca de la posible relación entre los genotipos de VPH y la presencia de las principales bacterias anaerobias en mujeres mexicanas con cáncer cervicouterino, por ello se propone la siguiente pregunta de investigación:

Pregunta de investigación: ¿Existe asociación entre los genotipos del virus del papiloma humano con bacterias anaerobias vinculadas al desarrollo de neoplasia cervical en mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino?

3. Justificación

El cáncer cervicouterino (CaCu) es provocado en un 98.8% por el virus del papiloma humano (VPH), donde el 70% de los casos se asocian a los genotipos de alto riesgo 16 y 18. Es considerado un problema de salud pública, incluso hay investigaciones que denotan un aumento considerable de los casos y muertes en un plazo de 5 años. A raíz de ello, se han determinado pruebas de cribado para la detección precoz de la neoplasia y la aplicación de vacunas para la prevención de la infección por el VPH, pero los datos de mortalidad por cáncer siguen siendo altos a pesar de ello.

La infección por el VPH es una causa necesaria para el establecimiento del cáncer cervicouterino, pero no suficiente. Para el desarrollo del cáncer, el microbioma cervicovaginal es un factor importante para que promueva la persistencia del virus. Se ha visto una relación entre la neoplasia y el desequilibrio microbiano, dado principalmente por la disminución de *Lactobacillus* y el aumento de bacterias anaerobias.

En 2011, Ravel y cols. encontraron a un grupo de mujeres que presentaban una dominancia de bacterias anaerobias en su ecosistema cervicovaginal, entre las cuales estaban *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Sneathia* spp. y *Fusobacterium* spp., especies actualmente encontradas en mujeres con infección por VPH y estadios de CIN. Existen estudios que han asociado algunas especies de bacterias anaerobias con la infección del virus del papiloma humano, pero ninguno lo ha hecho con los genotipos en específico.

La detección de los genotipos del VPH y la de estas bacterias en mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino resulta esencial para conocer si existe una asociación entre la presencia de algún tipo del VPH y la de alguna bacteria en específico, que finalmente promueva la infección persistente por el virus y el posterior desarrollo del cáncer cervicouterino. Este análisis permitiría conocer la especie bacteriana anaerobia más significativa en la infección por VPH en el grupo poblacional blanco, lo que posteriormente ayudaría a realizar estudios que la analicen como marcador microbiológico de la infección por VPH. Finalmente se podría lograr generar una opción nueva para la detección oportuna de la patología.

México es un país en desarrollo que utiliza técnicas de cribado para la detección del VPH y cáncer cervicouterino poco vanguardistas, siendo una de ellas las citologías vaginales. Dicha

técnica identifica la infección por el virus, pero desconoce si es de alto o bajo riesgo. Por otra parte, tampoco resulta de utilidad para la detección de bacterias que puedan ser patógenas. Por ello, los resultados de esta investigación permitirán establecer métodos de detección de genotipos y de bacterias anaerobias por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que podrían utilizarse en un futuro como métodos de diagnóstico.

4. Hipótesis

Hi: Si existe asociación entre los genotipos del virus del papiloma humano con bacterias anaerobias vinculadas al desarrollo de neoplasia cervical en mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino.

Ho: No existe asociación entre los genotipos del virus del papiloma humano con bacterias anaerobias vinculadas al desarrollo de neoplasia cervical en mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino.

5. Objetivos

General: Determinar la asociación entre los genotipos del virus del papiloma humano con bacterias anaerobias vinculadas al desarrollo de neoplasia cervical en mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino.

Específicos:

1. Detectar los genotipos del VPH presentes en muestras de ADN metagenómico de mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino.
2. Detectar la presencia de *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Sneathia* spp. y *Fusobacterium* spp. (bacterias anaerobias vinculadas al desarrollo de neoplasia cervical) en muestras de ADN metagenómico de mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino.
3. Confirmar por identificación genética las especies de bacterias anaerobias vinculadas al desarrollo de neoplasia cervical detectadas en muestras de ADN metagenómico de mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino.
4. Asociar los genotipos del VPH con las especies de bacterias anaerobias vinculadas al desarrollo de neoplasia cervical encontradas en muestras de ADN metagenómico de mujeres mexicanas con y sin cáncer cervicouterino.

6. Metodología

6.1 Diseño de Estudio

Tipo de estudio: Cuantitativo, transversal, retrospectivo, descriptivo.

Universo: Muestras de ADN metagenómico de mujeres con y sin cáncer cervicouterino del Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

Método de muestreo: Muestreo no probabilístico, por conveniencia.

Tamaño de muestra: 60 muestras de ADN metagenómico divididas en dos grupos:

Grupo 1: Muestras de ADN metagenómico con diagnóstico positivo de CaCu (n=30).

Grupo 2: Muestras de ADN metagenómico con diagnóstico negativo de CaCu (n=30).

6.2 Descripción del origen de las muestras

Las muestras que fueron utilizadas para la presente investigación se encuentran resguardadas en el Laboratorio de Investigación en Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México. Las muestras se obtuvieron previamente a partir de un estudio de cohorte de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado y mujeres sin la patología, todas ellas adscritas al Instituto Nacional de Cancerología de México. La recolección de muestras se llevó a cabo de febrero del 2016 a febrero del 2018. Las características de las mujeres participantes, así como el método para la toma de muestras de exudado cervicovaginal y de la obtención posterior de ADN metagenómico se describen en estudios previos (75, 76).

6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

-Criterios inclusión

- Muestras de ADN metagenómico de mujeres con diagnóstico positivo para cáncer cervicouterino provenientes del Instituto Nacional de Cancerología.
- Muestras de ADN metagenómico de mujeres con diagnóstico negativo para cáncer cervicouterino provenientes del Instituto Nacional de Cancerología.

-Criterios exclusión

- Muestras de ADN metagenómico que no sean viables o no se encuentren en condiciones apropiadas para su análisis, por ejemplo, baja concentración de ADN metagenómico (menor a 10 ng/ μ L), niveles no óptimos de pureza (relación 260/280 menor a 1.8 o

superior a 2 en lectura de absorbancia) o ADN metagenómico degradado (analizado por electroforesis).

- Muestras de ADN metagenómico que no tengan el volumen suficiente para su análisis (menor a 20 μ L).

-Criterios eliminación

- Muestras de ADN metagenómico que no detecten los genotipos de VPH ni la presencia de las bacterias anaerobias incluidas en el estudio.

6.4 Procedimientos

6.4.1 Análisis de la concentración, pureza y calidad del ADN

Para determinar la idoneidad de las muestras de ADN metagenómico que se utilizaron en el estudio, se descongelaron a temperatura ambiente, posteriormente se determinó su concentración por espectrofotometría en un espectrofotómetro de luz UV EPOCH (BioTek Instruments, Inc, 1503278) a longitudes de onda de 260 a 280 nm. Subsiguientemente se determinó la integridad del material genético mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarosea, BIO BASIC, Cat: D0012) al 1% bajo las siguientes condiciones: 120V, 3000mA, 50W por 45 minutos, con un marcador de peso molecular de 1kb (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Cat: SM0313). El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio (Ethidium bromide for molecular biology, SIGMA Life Science, Cat: 18096DJ) y se visualizó en un fotodocumentador (Syngene model no GVM20, SYGV/4779). Para la determinación del volumen de ADN, los tubos en los que estaba contenido se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto y se determinó el volumen comparándolos con otros contenidos similares en distintos tubos.

6.4.2 Conformación de los grupos

Una vez determinadas las condiciones de las muestras de ADN metagenómico, se formaron los dos grupos de acuerdo con lo establecido en los criterios de inclusión y exclusión, es decir, un grupo conformado por 30 muestras de ADN metagenómico obtenido a partir de exudados cervicovaginales de mujeres con cáncer cervicouterino localmente avanzado, considerado como grupo de estudio y un grupo conformado por 30 muestras de ADN metagenómico obtenido a partir de muestras de exudado cervicovaginal de mujeres con diagnóstico negativo para cáncer cervicouterino, que funge como grupo control.

6.4.3. Detección del oncogen E6-E7 del virus del papiloma humano por PCR

Una vez elegidas las muestras de ADN metagenómico idóneas, se realizó la detección de los genotipos del virus del papiloma humano. Para ello se amplificó en primer lugar el oncogen viral E6-E7 mediante PCR con cebadores específicos bajo condiciones modificadas de las establecidas por Sotlar y cols. (77). Para la amplificación, se usó un termociclador (MaxyGene II, 1406139), Taq Polimerasa (MyTaq DNA Polymerase, meridian Bioscience, Cat: Bio-21105) y buffer (5x MyTaq Reaction Buffer, Biosciencie, Lote: MTB-121312A). Las condiciones de PCR que se utilizaron fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 40°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos y extensión final a 72° por 10 minutos. Las características de los cebadores se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los cebadores específicos para la amplificación del oncogen E6/E7 del VPH

Oncogen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (bp)
E6-E7	GPE63F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	630
	GPE75B/ GPE76B	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	

Tomado de Sotlar y cols., 2004 (77)

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarosea, BIO BASIC, Cat: D0012) al 1% bajo las siguientes condiciones: 120V, 3000mA, 50W, con una duración de 1 hora y 30 minutos. Se utilizaron 5 µL del producto de PCR y se usó un marcador de peso molecular de 1 kb (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Cat: SM0313). El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio (Ethidium bromide for molecular biology, SIGMA Life Science, Cat: 18096DJ) y se visualizó mediante un fotodocumentador (Syngene model no GVM20, SYGV/4779). Se buscó la presencia de una banda en la posición correspondiente a 630 pb.

6.4.4 Detección de los genotipos del virus del papiloma humano por PCR multiplex

Una vez amplificado el oncogen E6-E7, el producto de PCR obtenido se utilizó como molde para la detección de los genotipos del VPH mediante una PCR multiplex anidada. Para este procedimiento se amplificaron 4 cocteles o grupos de cebadores específicos para determinar los

genotipos de bajo riesgo (6/11, 42, 43, 44) y alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 y 68) como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Grupos de cebadores específicos que se utilizarán para la detección de los genotipos de VPH

Coctel	Genotipo de VPH	Cebador	Tamaño del amplicón	Secuencia	
1	16	16F	457	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC	
		16R		CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	
	18	18F	322	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	
		18R		GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	
	31	31F	263	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G	
		31R		CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	
	45	45F	151	GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG	
		45R		ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	
2	33	33F	398	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA	
		33R		GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	
	6/11	6/11F	334	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC	
		6/11R		TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	
	58	58F	274	GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC	
		58R		GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	
	52	52F	229	TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG	
		52R		CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	
	56	56F	181	GTG TGC AGA GTA TGT TTA TTG	
		56R		TTT CTG TCA CAA TGC AAT TGC	
	3	35	35F	358	CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C
			35R		CCG ACC TGT CCA CCG TCC ACC G
42		42F	277	CCC AAA GTA GTG GTC CCA GTT A	
		42R		GAT CTT TCG TAG TGT CGC AGT G	
43		43F	219	GCA TAA TGT CTG CAC GTA GCT G	
		43R		CAT GAA ACT GTA GAC AGG CCA AG	
44	44F	163	TAA ACA GTT ATA TGT AGT GTA CCG		
	44R		TAT CAG CAC GTC CAG AAT TGA C		
4	68	68F	333	GCA GAA GGC AAC TAC AAC GG	
		68R		GTT TAC TGG TCC AGC AGT GG	
	39	39F	280	GAC GAC CAC TAC AGC AAA CC	
		39R		TTA TGA AAT CTT CGT TTG CT	
	51	51F	223	GAG TAT AGA CGT TAT AGC AGG	
		51R		TTT CGT TAC GTT GTC GTG TAC G	
	56	56F	172	TTC AGT GTA TGG GGC AAC AT	
		56R		AAA CAT GAC CCG GTC CAT GC	

Tomado de Sotlar y cols., 2004 (77)

Para la amplificación, se utilizó un termociclador (MaxyGene II, 1406139), Taq Polimerasa (MyTaq DNA Polymerase, meridian Bioscience, Cat: Bio-21105) y buffer (5x MyTaq Reaction Buffer, Biosciencie, Lote: MTB-121312A). Las condiciones que se utilizaron para las PCR multiplex de los cuatro grupos de cebadores específicos fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos,

alineamiento a 56°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos y extensión final a 72° por 4 minutos. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Agarosea, BIO BASIC, Cat: D0012) al 2% utilizando 10µL del producto de PCR y un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Cat: SM0243) bajo las siguientes condiciones: 120V, 3000mA, 50W, con una duración de 1 hora y 50 minutos. El gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio (Ethidium bromide for molecular biology, SIGMA Life Science, Cat: 18096DJ) y se visualizó mediante un fotodocumentador (Syngene model no GVM20, SYGV/4779).

6.4.5 Detección de bacterias anaerobias por PCR

La detección de las cuatro bacterias anaerobias objetivo de este estudio (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Sneathia* spp y *Fusobacterium* spp) se realizó mediante PCR y cebadores específicos. Las características de los cebadores se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de los cebadores para la detección de bacterias anaerobias

Bacteria	Cebador	Tamaño del amplicón (bp)	Secuencia (5'-3')
<i>Gardnerella vaginalis</i> (78)	Gard154-454	301	CTCTTGAAACGGGTGGTAA TTGCTCCAATCAAAAGCGGT
<i>Atopobium vaginae</i> (79)	Atop109-329	221	GAGTAACACGTGGGCAACCT CCGTGTCTCAGTCCAATCT
<i>Sneathia</i> spp (80)	Lepto-395F Lepto-646R	252	CAATCTGTGTGTGTGAAGAAG ACAGTTTTGTAGGCAAGCCTAT
<i>Fusobacterium</i> spp (56)	FUSO1 FUSO2	610	GAG AGA GCT TTG CGT CC TGG GCG CTG AGG TTC GAC

Herniques y cols., 2018 (78); Salinas y cols., 2007 (79); Friedrichs y cols., 2019 (80); Nagano y cols. 2016 (56).

Para la amplificación, se utilizó un termociclador (MaxyGene II, 1406139), Taq Polimerasa (MyTaq DNA Polymerase, meridian Bioscience, Cat: Bio-21105) y buffer (5x MyTaq Reaction Buffer, Biosciencie, Lote: MTB-121312A). Las condiciones que se utilizaron para la PCR fueron las siguientes:

-*Gardnerella vaginalis*: Un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 62°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 5 minutos y extensión final a 72°C por 5 minutos.

- *Atopobium vaginae*: Un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 62°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y extensión final a 72°C por 5 minutos.

-*Sneathia* spp.: Un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y extensión final a 72°C por 7 minutos.

-*Fusobacterium* spp.: Un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y extensión final a 72°C por 7 minutos.

Para detectar la amplificación de todas las bacterias, se realizó una electroforesis en gel agarosa (Agarosea, BIO BASIC, Cat: D0012) al 2% con un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Cat: SM0243) bajo las siguientes condiciones: 120V, 3000mA, 50W, con una duración de 35 minutos. El gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio (Ethidium bromide for molecular biology, SIGMA Life Science, Cat: 18096DJ) y se visualizó en un fotodocumentador (Syngene model no GVM20, SYGV/4779).

6.4.6 Identificación genética bacteriana

Para determinar la especificidad de los cebadores utilizados, se identificaron genéticamente las especies de bacterias anaerobias detectadas en este estudio. Para ello, se seleccionó al azar un amplicón representativo de cada especie y se envió al servicio de secuenciación de MacroGen Corea. Las secuencias obtenidas se procesaron con el programa Bioedit 7.1.9 (81) y se compararon con la base de datos BLAST del Centro Nacional de Biotecnología de Estados Unidos (NCBI) (82) y EZ BioCloud (83).

6.4.7 Análisis comparativo

La información obtenida se capturó en una base de datos en el programa Excel y se utilizó el programa estadístico STATA versión 15 (84). Para el análisis de datos obtenidos se utilizó estadística descriptiva, posteriormente se aplicaron métodos de análisis estadísticos para la diferencia de proporciones y se realizó una correlación con regresión lineal para determinar la asociación entre los genotipos de VPH y las bacterias anaerobias del estudio.

6.5 Variables de Estudio

Independientes: Genotipos de virus del papiloma humano (VPH)

Dependientes: Bacterias anaerobias.

Intervinientes: No hay variables intervinientes.

6.6 Operacionalización de variables

Tabla 5. Operacionalización de las variables de estudio

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis estadístico
Genotipo de virus de papiloma humano	Variedad del virus del papiloma humano identificada mediante un análisis genético	Genotipos de bajo riesgo (6/11, 42, 43, 44) y genotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 y 68) detectados en ADN metagenómico	Dependiente, cualitativa, nominal	Presencia o ausencia. Número de genotipo	X ² o prueba exacta de Fisher
Bacterias anaerobias	Microorganismo que requiere una tensión de oxígeno reducida para crecer.	Bacterias anaerobias: <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Atopobium vaginae</i> , <i>Fusobacterium</i> spp. y <i>Sneathia</i> spp. detectadas en muestras de ADN metagenómico	Independiente, cualitativa, nominal	Presencia o ausencia. Especie de bacteria identificada	X ² o prueba exacta de Fisher

6.7 Implicaciones Bioéticas: El protocolo para la presente investigación cumple con los lineamientos de la declaración de Helsinki 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.

El trabajo de investigación principal y los consentimientos informados fueron 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.

Esta investigación está estrictamente dirigida hacia el respeto a la salud humana y a los principios bioéticos en la investigación científica.

6.8 Recolección de Datos: Los resultados obtenidos se capturaron en una base de datos en el programa Excel y posteriormente se utilizó el programa estadístico STATA versión 15.

6.9 Análisis Estadísticos: Para determinar la relación estadística de los datos obtenidos se usaron las pruebas estadísticas de X^2 y prueba exacta de Fisher para comparación de las variables categóricas. Posteriormente, se realizó regresión logística para el análisis de asociación de variables.

7. Resultados

7.1 Carta de envío del artículo

12/10/23, 13:18

Correo: Ninfa Ramírez Durán - Outlook

Spandidos Publications, submission finalized

submissions=spandidos-publications.com@osats.spandidos-publications.com
<submissions=spandidos-publications.com@osats.spandidos-publications.com>
en nombre de
submissions@spandidos-publications.com <submissions@spandidos-publications.com>
Jue 12/10/2023 19:13
Para:Ninfa Ramírez Durán <nr Ramirezd@uaemex.mx>

Dear Dr Ninfa Ramírez-Durán,

Thank you for submitting your manuscript.

Your submission has been received successfully, and has been assigned the electronic submission number: 302984

Please click on the link below and log in to access and track the progress of your submission:

<https://www.spandidos-publications.com/osats/>

Your submission will first be checked for completeness and conformance to our guidelines. In the event that any corrections are required prior to evaluation you will be notified shortly. Once your submission has passed our initial checks it will be sent for evaluation by our Editorial Office.

Subsequently, the final decision will be forwarded to you at that time.

Kind regards,

Spandidos Publications

7.2 Resumen del artículo

Submitted to Molecular Medicine Reports

Association of *Sneathia* spp, *Fusobacterium* spp, and *Lactobacillus crispatus* with human papillomavirus genotypes 16 and 18 in women with and without cervical cancer

Running Title: Hernandez et al.: Association of cervicovaginal bacteria with the human papillomavirus

Key Words: Cervical cancer, human papilloma virus, *Sneathia* spp, *Fusobacterium* spp, *Lactobacillus crispatus*.

Submitted by: Ninfa Ramírez-Durán, received on 12-10-2023

Type of Article: Article

Abstract

This study aimed to determine the association between human papillomavirus (HPV) genotypes and the presence of anaerobic cervicovaginal bacteria in Mexican women with and without cervical cancer. A descriptive and cross-sectional study was carried out. Metagenomic DNA samples extracted from the cervicovaginal exudate of 60 National Institute of Cancerology (INCan) patients were included. Two study groups were formed: 30 samples from women with cervical cancer (CC) and a control group of 30 samples from women with negative cervical cytology. By Polymerase Chain Reaction (PCR), the E6-E7 oncogene, 18 HPV genotypes, and the presence of eight anaerobic bacteria related to cervicovaginal health and disease were detected using specific primers. Sociodemographic variables were also determined. The presence of bacteria, HPV genotypes, and sociodemographic variables were analyzed and associated by descriptive statistics and logistic regression. The HPV genotypes with the highest frequency were types 16 and 18 in both groups. *Sneathia* spp and *Fusobacterium* spp were detected as risk factors for the acquisition of these genotypes ($p = 0.031$, $OR = 3.44$; $p = 0.029$, $OR = 3.33$) and *Lactobacillus crispatus* as a protective factor against the presence of the virus ($p = 0.034$, $OR = 0.097$). *Sneathia* spp and *Fusobacterium* spp represent a risk against HPV infection, and *Lactobacillus crispatus* is protective in this Mexican population.

Authors

Name	Institute	Email Address
Miss Marian Jose Hernandez-Ramon	Autonomous University of the State of Mexico, School of Medicine, Laboratory of Medical and Environmental Microbiology.	hdezmarijo95@gmail.com
Mr Cristian Eduardo Guadarrama-Sanchez	Autonomous University of the State of Mexico, School of Medicine, Laboratory of Medical and Environmental Microbiology.	bios.cris1992@gmail.com
Dr Gaudy Lizeth Manzanares-Leal	Autonomous University of the State of Mexico, School of Medicine, Laboratory of Medical and Environmental Microbiology.	glmanzanaresl001@profesor.uaemex.mx
Dr Jaime Coronel-Martinez	National Institute of Cancerology, Department of Clinical Research and Medical Oncology	quiechc8@hotmail.com
Dr Miguel Rodriguez-Morales	National Autonomous University of Mexico, School of Medicine, Department of Embryology and Genetics.	leugimroselarom@gmail.com

Name	Institute	Email Address
Dr Lilia Patricia Bustamante-Montes	National Council of Humanities, Science and Technology (CONAHCYT), National System of Researchers.	patriciab@yahoo.com.mx
Dr Angel Horacio Sandoval-Trujillo	Autonomous Metropolitan University-Xochimilco, Biological Systems Department	hsandov@hotmail.com
Dr Ninfa Ramirez-Duran [Corresponding]	Autonomous University of the State of Mexico, School of Medicine, Laboratory of Medical and Environmental Microbiology.	nramirezd@uaemex.mx

8. Discusión

El cáncer cervicouterino es una de las enfermedades oncológicas más importantes y prevenibles en todo el mundo. Al ser una enfermedad multifactorial, diferentes factores contribuyen al desarrollo de esta, como la zona geográfica y el inicio de vida sexual activa temprana (85). De acuerdo con los resultados obtenidos, encontramos diferencias significativas entre habitar en zonas no conurbadas y el inicio de vida sexual antes de los 18 años con los genotipos 16 y 18. Dichos hallazgos sugieren que se investigue la genotipificación de VPH en zonas alejadas al área metropolitana, no solo desde el punto de vista médico, también cultural. De igual manera, se confirma que el inicio de vida sexual a corta edad es un factor de riesgo para contraer la infección y sin un cribado adecuado, el posterior desarrollo hacia CaCu.

Los genotipos 16 y 18 del virus del papiloma humano, se han identificado como factores de riesgo significativos para el desarrollo de cáncer cervicouterino (86). La detección temprana y la prevención de las infecciones por VPH se han convertido en elementos esenciales en la lucha contra esta enfermedad (87). En este estudio, los genotipos 16 y 18 del VPH en conjunto estuvieron presentes en ambos grupos de nuestra población, aunque en el grupo control se encontraron en menor número de mujeres. Esta alta prevalencia, por un lado, muestra la importancia de la vigilancia y el monitoreo continuo de estos genotipos, y, por otro lado, la necesidad de considerar enfoques de prevención y detección diferenciados según el riesgo de infección en distintos grupos poblacionales. Los genotipos de VPH presentes son diferentes a los encontrados en otras investigaciones en el mismo país (88), destacando así la importancia de realizar estudios epidemiológicos con base en la zona de estudio.

Tres de las cuatro bacterias a detectar (*Gardnerella vaginalis*, *Sneathia* spp y *Fusobacterium* spp) predominaron en el grupo de estudio, comparado con el grupo control, pero solo *Sneathia* spp y *Fusobacterium* spp se asociaron con la presencia de los genotipos 16 y 18, siendo ambas bacterias, factores de riesgo ante la infección por el virus del papiloma humano. Ambas especies han sido encontradas en algunas investigaciones donde su población de estudio son mujeres con CaCu (54, 89), aunque no son objetivo principal en los estudios de microbiota cervicovaginal. Algunos factores de virulencia en *Sneathia* spp (90) y la asociación de una especie de *Fusobacterium* con el cáncer colorectal (91) pueden contribuir a que ambas especies promuevan el establecimiento de patógenos como el VPH.

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos, podemos mencionar que hemos comprobado la hipótesis de trabajo, la cual nos indica que existe una asociación entre los genotipos del VPH y las bacterias anaerobias a detectar.

9. Conclusiones

La presencia de *Sneathia* spp y *Fusobacterium* spp en la población estudiada se asocia de manera significativa con un mayor riesgo de adquirir los genotipos 16 y 18 del VPH. Esto subraya la relevancia de comprender la microbiota habitual y patógena en el ecosistema cervicovaginal como un elemento crítico en la estrategia de prevención y control del VPH y del cáncer cervicouterino.

10. Referencias Bibliográficas

1. Cáncer [Internet]. [citado 21 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Wang JJ., Lei K., Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2018; 22: 3855-3864
3. Cervical cancer [Internet]. [citado 21 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/cervical-cancer>
4. Guido R. *Cervical Cancer Screening*. 2017
5. Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Seminars in Oncology Nursing*. abril de 2019;35(2):166-74.
6. Salud S de. Cáncer de Cuello Uterino [Internet]. gob.mx. [citado 23 de octubre de 2021]. Disponible en: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/cancer-de-cuello-uterino>
7. Lopez MS, Baker ES, Maza M, Fontes-Cintra G, Lopez A, Carvajal JM, et al. Cervical cancer prevention and treatment in Latin America. *J Surg Oncol*. abril de 2017;115(5):615-8.
8. Cancer today [Internet]. [citado 22 de septiembre de 2021]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
9. Olusola P, Banerjee HN, Philley JV, Dasgupta S. Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. *Cells*. 21 de junio de 2019;8(6):622.
10. Papilomavirus humanos (PVH) y cáncer cervicouterino [Internet]. [citado 16 de septiembre de 2021]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
11. Hatta MNA, Mohamad Hanif EA, Chin S-F, Neoh H. Pathogens and Carcinogenesis: A Review. *Biology*. 15 de junio de 2021;10(6):533.
12. Manini I, Montomoli E. Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. *annali di igiene medicina preventiva e di comunità*. 30 de agosto de 2018;(4):28-32.

13. Fajardo-Ramírez OR, Barboza-Cerda MC, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, Garza-Rodríguez ML, Sepúlveda-Flores A, et al. Prevalence and 3-year persistence of human papillomavirus serotypes in asymptomatic patients in Northern Mexico. *Int J Gynecol Obstet.* enero de 2017;136(1):40-6.
14. Bhatla N, Singhal S. Primary HPV screening for cervical cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* mayo de 2020;65:98-108.
15. Medeiros R, Vaz S, Rebelo T, Figueiredo-Dias M. Prevention of Human Papillomavirus Infection. *Beyond Cervical Cancer: A Brief Review. Acta Med Port.* 2 de marzo de 2020;33(3):198.
16. Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med.* octubre de 2018;7(10):5217-36.
17. Kaliterna V, Zvonimir B. Genital human papillomavirus infections. *Frontiers In Bioscience.* 2018; 23, 1587-1611
18. Castle PE, Murokora D, Perez C, Alvarez M, Quek SC, Campbell C. Treatment of cervical intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Obstet.* julio de 2017;138:20-5.
19. Zhang J, Cheng K, Wang Z. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia in China: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* diciembre de 2020;302(6):1329-37.
20. Yete S, D'Souza W, Saranath D. High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology.* 2018;94(3):133-41.
21. Hoffman SR, Le T, Lockhart A, Sanusi A, Dal Santo L, Davis M, et al. Patterns of persistent HPV infection after treatment for cervical intraepithelial neoplasia (CIN): A systematic review: Patterns of persistent HPV infection after treatment for CIN. *Int J Cancer.* 1 de julio de 2017;141(1):8-23.
22. Campos RG, Malacara Rosas A, Gutiérrez Santillán E, Delgado Gutiérrez M, Torres Orozco RE, García Martínez ED, et al. Unusual prevalence of high-risk genotypes of human papillomavirus in a group of women with neoplastic lesions and cervical cancer from Central Mexico. Grce M, editor. *PLoS ONE.* 18 de abril de 2019;14(4):e0215222.

23. Nieves-Ramírez ME, Partida-Rodríguez O, Moran P, Serrano-Vázquez A, Pérez-Juárez H, Pérez-Rodríguez ME, et al. Cervical Squamous Intraepithelial Lesions Are Associated with Differences in the Vaginal Microbiota of Mexican Women. Claesen J, editor. *Microbiol Spectr*. 13 de octubre de 2021;e00143-21.
24. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 15 de marzo de 2011;108(Supplement_1):4680-7.
25. Liang Y, Chen M, Qin L, Wan B, Wang H. A meta-analysis of the relationship between vaginal microecology, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Infect Agents Cancer*. diciembre de 2019;14(1):29.
26. Romero-Morelos P, Bandala C, Jiménez-Tenorio J, Valdespino-Zavala M, Rodríguez-Esquivel M, Gama-Ríos RA, et al. Bacterias relacionadas con vaginosis bacteriana y su asociación a la infección por virus del papiloma humano. *Medicina Clínica*. enero de 2019;152(1):1-5.
27. Yang X, Da M, Zhang W, Qi Q, Zhang C, Han S. Role of *Lactobacillus* in cervical cancer. *CMAR*. mayo de 2018;Volume 10:1219-29.
28. Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, Lee YS, Bennett PR, Kyrgiou M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome*. diciembre de 2016;4(1):58.
29. Bertuccini L, Russo R, Iosi F, Superti F. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* on bacterial vaginal pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol*. junio de 2017;30(2):163-7.
30. Łaniewski P, Barnes D, Goulder A, Cui H, Roe DJ, Chase DM, et al. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women. *Sci Rep*. diciembre de 2018;8(1):7593.
31. Godoy-Vitorino F, Romaguera J, Zhao C, Vargas-Robles D, Ortiz-Morales G, Vázquez-Sánchez F, et al. Cervicovaginal Fungi and Bacteria Associated With Cervical Intraepithelial Neoplasia and High-Risk Human Papillomavirus Infections in a Hispanic Population. *Front Microbiol*. 23 de octubre de 2018;9:2533.

32. So KA, Yang EJ, Kim NR, Hong SR, Lee J-H, Hwang C-S, et al. Changes of vaginal microbiota during cervical carcinogenesis in women with human papillomavirus infection. Consolaro MEL, editor. PLoS ONE. 17 de septiembre de 2020;15(9):e0238705.
33. Tango CN, Seo S-S, Kwon M, Lee D-O, Chang HK, Kim MK. Taxonomic and Functional Differences in Cervical Microbiome Associated with Cervical Cancer Development. Sci Rep. diciembre de 2020;10(1):9720.
34. Klein C, Kahesa C, Mwaeselage J, West JT, Wood C, Angeletti PC. How the Cervical Microbiota Contributes to Cervical Cancer Risk in Sub-Saharan Africa. Front Cell Infect Microbiol. 12 de febrero de 2020;10:23.
35. Lara Ruiz-Gómez M, Martin-Way D, Pérez-Ramírez M, Gutiérrez-Fernández J. Infecciones profundas por *Gardnerella vaginalis* en el varón. Revisión de la literatura y a propósito de un caso. Rev Esp Quimioter. 2019; 32(5): 469-472
36. Sorlózano-Puerto A, Esteban-Sanchís P, Heras-Cañas V, Fernández-Parra J, Navarro-Mari JM, Gutiérrez-Fernández J. Estudio prospectivo de la incidencia de patógenos genitales oportunistas y estrictos que crecen en medios de cultivo artificiales. Revista del Laboratorio Clínico. julio de 2018;11(3):123-30.
37. Mendling W, Palmeira-de-Oliveira A, Biber S, Prasauskas V. An update on the role of *Atopobium vaginae* in bacterial vaginosis: what to consider when choosing a treatment? A mini review. Arch Gynecol Obstet. julio de 2019;300(1):1-6.
38. Janulaitiene M, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauskiene A, Marcinkute A, et al. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups in women with and without bacterial vaginosis. BMC Infect Dis. diciembre de 2017;17(1):394.
39. Tarracchini C, Lugli GA, Mancabelli L, Milani C, Turrone F, Ventura M. Assessing the Genomic Variability of *Gardnerella vaginalis* through Comparative Genomic Analyses: Evolutionary and Ecological Implications. McBain AJ, editor. Appl Environ Microbiol [Internet]. 17 de diciembre de 2020 [citado 23 de octubre de 2021];87(1). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02188-20>

40. Chen Y, Qiu X, Wang W, Li D, Wu A, Hong Z, et al. Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia progression are associated with increased vaginal microbiome diversity in a Chinese cohort. *BMC Infect Dis.* diciembre de 2020;20(1):629.
41. Muzny CA, Taylor CM, Swords WE, Tamhane A, Chattopadhyay D, Cerca N, et al. An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *The Journal of Infectious Diseases.* 26 de septiembre de 2019;220(9):1399-405.
42. Castro J, Rosca AS, Cools P, Vaneechoutte M, Cerca N. Gardnerella vaginalis Enhances Atopobium vaginae Viability in an in vitro Model. *Front Cell Infect Microbiol.* 4 de marzo de 2020;10:83.
43. Hardy L, Cerca N, Jaspers V, Vaneechoutte M, Crucitti T. Bacterial biofilms in the vagina. *Research in Microbiology.* noviembre de 2017;168(9-10):865-74.
44. Kovachev SM. Cervical cancer and vaginal microbiota changes. *Arch Microbiol.* marzo de 2020;202(2):323-7.
45. Carrillo-Ng H, Becerra-Goicochea L, Tarazona-Castro Y, Pinillos-Vilca L, del Valle LJ, Aguilar-Luis MA, et al. Variations in cervico-vaginal microbiota among HPV-positive and HPV-negative asymptomatic women in Peru. *BMC Res Notes.* diciembre de 2021;14(1):4.
46. Zhang Z, Li T, Zhang D, Zong X, Bai H, Bi H, et al. Distinction between vaginal and cervical microbiota in high-risk human papilloma virus-infected women in China. *BMC Microbiol.* diciembre de 2021;21(1):90.
47. Fettweis JM, Serrano MG, Brooks JP, Edwards DJ, Girerd PH, Parikh HI, et al. The vaginal microbiome and preterm birth. *Nat Med.* junio de 2019;25(6):1012-21.
48. Theis KR, Florova V, Romero R, Borisov AB, Winters AD, Galaz J, et al. *Sneathia* : an emerging pathogen in female reproductive disease and adverse perinatal outcomes. *Critical Reviews in Microbiology.* 4 de julio de 2021;47(4):517-42.
49. Gottschick C, Deng Z-L, Vital M, Masur C, Abels C, Pieper DH, et al. Treatment of biofilms in bacterial vaginosis by an amphoteric tenside pessary-clinical study and microbiota analysis. *Microbiome.* diciembre de 2017;5(1):119.

50. Zhou Y, Wang L, Pei F, Ji M, Zhang F, Sun Y, et al. Patients With LR-HPV Infection Have a Distinct Vaginal Microbiota in Comparison With Healthy Controls. *Front Cell Infect Microbiol.* 28 de agosto de 2019;9:294.
51. Xie Y, Feng Y, Li W, Zhan F, Huang G, Hu H, et al. Revealing the Disturbed Vaginal Microbiota Caused by Cervical Cancer Using High-Throughput Sequencing Technology. *Front Cell Infect Microbiol.* 7 de diciembre de 2020;10:538336.
52. Liu J, Luo M, Zhang Y, Cao G, Wang S. Association of high-risk human papillomavirus infection duration and cervical lesions with vaginal microbiota composition. *Ann Transl Med.* septiembre de 2020;8(18):1161-1161.
53. Cheng L, Norenhag J, Hu YOO, Brusselaers N, Fransson E, Ährlund-Richter A, et al. Vaginal microbiota and human papillomavirus infection among young Swedish women. *npj Biofilms Microbiomes.* diciembre de 2020;6(1):39.
54. Mortaki D, Gkegkes ID, Psomiadou V, Blontzos N, Prodromidou A, Lefkopoulos F, et al. Vaginal microbiota and human papillomavirus: a systematic review. *J Turkish German Gynecol Assoc.* 1 de septiembre de 2020;21(3):193-200.
55. Wu S, Ding X, Kong Y, Acharya S, Wu H, Huang C, et al. The feature of cervical microbiota associated with the progression of cervical cancer among reproductive females. *Gynecologic Oncology.* septiembre de 2021;S0090825821013147.
56. Nagano Y, Watabe M, Porter KG, Coulter WA, Millar BC, Elborn JS, et al. Development of a genus-specific PCR assay for the molecular detection, confirmation and identification of *Fusobacterium* spp. *British Journal of Biomedical Science.* enero de 2007;64(2):74-7.
57. Gholizadeh P, Eslami H, Kafil HS. Carcinogenesis mechanisms of *Fusobacterium nucleatum*. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* mayo de 2017;89:918-25.
58. Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol.* marzo de 2019;17(3):156-66.
59. Norenhag J, Du J, Olovsson M, Verstraelen H, Engstrand L, Brusselaers N. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis. *BJOG: Int J Obstet Gy.* enero de 2020;127(2):171-80.

60. Huang S-T, Chen J, Lian L-Y, Cai H-H, Zeng H-S, Zheng M, et al. Intratumoral levels and prognostic significance of *Fusobacterium nucleatum* in cervical carcinoma. aging [Internet]. 14 de noviembre de 2020 [citado 24 de octubre de 2021]; Disponible en: <http://www.aging-us.com/article/104188/text>
61. Misyura M, Sukhai MA, Kulasignam V, Zhang T, Kamel-Reid S, Stockley TL. Improving validation methods for molecular diagnostics: application of Bland-Altman, Deming and simple linear regression analyses in assay comparison and evaluation for next-generation sequencing. J Clin Pathol. febrero de 2018;71(2):117-24.
62. Scagnolari C, Turriziani O, Monteleone K, Pierangeli A, Antonelli G. Consolidation of molecular testing in clinical virology. Expert Review of Anti-infective Therapy. 3 de abril de 2017;15(4):387-400.
63. Ramya A, Majumdar S, Babu Tm, Uppala D, Srinivas B, Rao A. Expression of human papillomavirus dna and p53 polymorphisms through polymerase chain reaction in normal mucosa and oral leukoplakia individuals with deleterious oral habits. Int J App Basic Med Res. 2017;7(2):134.
64. Pérez-Soto E, Fernández-Martínez E, Oros-Pantoja R, Medel-Flores O, Miranda-Covarrubias JC, Sánchez-Monroy V. Proinflammatory and Oxidative Stress States Induced by Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis Coinfection Affect Sperm Quality in Asymptomatic Infertile Men. Medicina (Mex). 24 de agosto de 2021;57(9):862.
65. Shang JY, Zhang GJ, Liao S, Huang Y, Yu WJ, He W, et al. A multiplex PCR for differential detection of *Echinococcus granulosus sensu stricto*, *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus canadensis* in China. Infect Dis Poverty. diciembre de 2019;8(1):68.
66. Bonyadian M, Moshtaghi H, Nadi H. PCR detection of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella sp.* from bottled drinking water in Iran. J Infect Dev Ctries. 30 de septiembre de 2018;12(09):700-5.
67. Chaimayo C, Kaewnaphan B, Tanlieng N, Athipanyasilp N, Sirijatuphat R, Chayakulkeeree M, et al. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand. Virol J. diciembre de 2020;17(1):177.

68. Awan MS. Comparison of Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry Assays for Analysing Human Papillomavirus Infection in Oral Squamous Cell Carcinoma. JCDR [Internet]. 2017 [citado 24 de octubre de 2021]; Disponible en: http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2017&volume=11&issue=6&page=XC10&issn=0973-709x&id=10119
69. Li H, Bai R, Zhao Z, Tao L, Ma M, Ji Z, et al. Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases. *Bioscience Reports*. 21 de diciembre de 2018;38(6):BSR20181170.
70. Rajapaksha P, Elbourne A, Gangadoo S, Brown R, Cozzolino D, Chapman J. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *Analyst*. 2019;144(2):396-411.
71. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. octubre de 2018;24(10):1055-63..
72. Chowdary Sd, Sekhar Pc, Kattapagari K, Mani Deepthi C, Neelima D, Ramana Reddy B. A study to assess expression of human papillomavirus types 16 and 18 in oral squamous cell carcinoma using polymerase chain reaction. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018;22(3):347.
73. Liu C-F, Shi X-P, Chen Y, Jin Y, Zhang B. Rapid diagnosis of sepsis with TaqMan-Based multiplex real-time PCR. *J Clin Lab Anal*. febrero de 2018;32(2):e22256.
74. Choi J, Kim C, Lee HS, Choi YJ, Kim HY, Lee J, et al. Detection of Human Papillomavirus in Korean Breast Cancer Patients by Real-Time Polymerase Chain Reaction and Meta-Analysis of Human Papillomavirus and Breast Cancer. *J Pathol Transl Med*. 15 de noviembre de 2016;50(6):442-50.
75. Manzanares Leal G. ESTUDIO DE LAS VARIACIONES DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN CÉRVIX DE MUJERES ATENDIDAS EN EL INCAN DURANTE EL TRATAMIENTO POR CÁNCER CERVICOUTERINO [tesis doctoral]. Universidad Autónoma del Estado de México; 2018
76. Manzanares-Leal G, Coronel-Martínez J, Rodríguez.Morales M, Bustamante-Montes L, Sandoval-Trujillo H, Ramirez.Duran N. Changes in the diversity of local cervical bacteria in women with cervical cancer receiving antineoplastic treatment. *J Res Med Sci*. 2021;26(1):56.

77. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* julio de 2004;42(7):3176-84.
78. Henriques A, Cereija T, Machado A, Cerca N. In silico vs in vitro analysis of primer specificity for the detection of *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* and *Lactobacillus* spp. *BMC Res Notes.* diciembre de 2012;5(1):637.
79. Salinas AM, Osorio VG, Endara PF, Salazar ER, Vasco GP, Vivero SG, et al. Bacterial identification of the vaginal microbiota in Ecuadorian pregnant teenagers: an exploratory analysis. *PeerJ.* 21 de febrero de 2018;6:e4317.
80. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for Detection of Vaginal Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. *J Clin Microbiol.* octubre de 2007;45(10):3270-6.
81. 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.
82. Altschul S, Gish W, Miller W, et. al. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 1990; 215(3): 403-410.
83. 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.
84. StataCorp. 2011. *Stata Statistical Software: Release 12.* College Station, TX: Stata Corp LP.
85. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 3 de julio de 2020;40(5):602-8.
86. Oyervides-Muñoz MA, Pérez-Maya AA, Sánchez-Domínguez CN, Berlanga-Garza A, Antonio-Macedo M, Valdéz-Chapa LD, et al. Multiple HPV Infections and Viral Load Association in Persistent Cervical Lesions in Mexican Women. *Viruses.* 31 de marzo de 2020;12(4):380.

87. Ntanasis-Stathopoulos I, Kyriazoglou A, Lontos M, Gavriatopoulou M. Current trends in the management and prevention of human papillomavirus (HPV) infection. *JBUON*. 2020; 25(3): 1281-1285.
88. Molina-Pineda A, López-Cardona MG, Limón-Toledo LP, Cantón-Romero JC, Martínez-Silva MG, Ramos-Sánchez HV, et al. High frequency of HPV genotypes 59, 66, 52, 51, 39 and 56 in women from Western Mexico. *BMC Infect Dis*. diciembre de 2020;20(1):889.
89. Wahid M, Dar SA, Jawed A, Mandal RK, Akhter N, Khan S, et al. Microbes in gynecologic cancers: Causes or consequences and therapeutic potential. *Seminars in Cancer Biology*. noviembre de 2022;86:1179-89.
90. Theis KR, Florova V, Romero R, Borisov AB, Winters AD, Galaz J, et al. *Sneathia* : an emerging pathogen in female reproductive disease and adverse perinatal outcomes. *Critical Reviews in Microbiology*. 4 de julio de 2021;47(4):517-42.
91. Datorre JG, de Carvalho AC, Guimarães DP, Reis RM. The Role of *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Carcinogenesis. *Pathobiology*. 2021;88(2):127-40.