



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**“Caracterización de la Diversidad de la Microbiota
Vaginal de Mujeres Mexicanas con Candidiasis
Vulvovaginal Recurrente”**

Tesis que presenta

Janet Pineda Díaz
Médico Cirujano

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de la tesis

Dr. En C. Jaime García Mena

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Referencia y Apoyo para la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular, bajo la dirección del Dr. En C. Jaime García Mena en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.



Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia técnica con los reactivos, al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con el material del laboratorio y a la Ing. Linda Zuleyma Quijano por su apoyo administrativo.

Se agradece al Dr. en C. Selvasankar Murugesan y a la Dra. en C. Rosa María Pineda Mendoza por su apoyo en la realización del trabajo experimental y al M. en C. Otoniel Maya Lucas por el apoyo en el análisis bioinformático.

Para la realización de este trabajo se recibió apoyo del CINVESTAV, CONACyT 163235 INFR-2011-01, FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT-233361 y CONACyT PNPC 2014, así como la beca para maestría CONACyT PNPC número 336380.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco al Cinvestav y al Departamento de Genética y Biología Molecular por permitirme realizar este proyecto y por permitir que médicos como yo nos acerquemos a la investigación científica.

Agradezco también a todos aquellos involucrados de alguna forma en la realización de este trabajo:

Al Dr. Jaime García Mena por permitirme trabajar en su laboratorio y por la orientación y apoyo brindado durante este tiempo.

A mis asesores, Dra. Beatriz Xoconostle Cázares y Dr. Patricio Gariglio Vidal, por haber aceptado participar conmigo en este trabajo y por todos los consejos y ayuda que me brindaron.

A la Dra. Yuliana Gómez Meraz por el gran esfuerzo que realizó para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

Al personal administrativo del Departamento de Genética y Biología Molecular, en especial a Gabriela Mora Macías por la gran labor que realiza en la coordinación académica.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Margarita, Gamaliel, Jennifer y Magui por siempre apoyarme en todas mis decisiones profesionales y por ser mi motivación diaria.

A Yuliana, por los más de diez años de amistad y por confiar en este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Rosa, Selva, Valeria, Cynthia, Daniela, Aurora, Fernando, Otoniel y Khem por todo lo que me enseñaron a lo largo de este año y por la amistad que me han brindado que sé durará para siempre.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Candidiasis Vulvovaginal	1
1.1 Definición	1
1.2 Epidemiología	2
1.3 Fisiopatología	3
1.4 Factores de Riesgo	4
1.5 Clínica	6
1.6 Tratamiento	7
2. <i>Candida albicans</i>	8
2.1 Características generales	8
2.2 Factores de virulencia	8
3. Microbiota vaginal	12
4. Microbiota y Candidiasis Vulvovaginal	17
II. JUSTIFICACIÓN	19
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
1. Objetivo General	20
2. Objetivos Específicos	20
V. ALCANCE	20
VI. METODOLOGÍA	21
1. Plan de trabajo	21
2. Diseño experimental	22
Criterios de Inclusión	22
Criterios de Exclusión	23
3. Métodos.	23

3.1	Toma de muestra de hisopado vaginal	23
3.2	Extracción de DNA de muestras de hisopado vaginal	24
3.3	Amplificación por PCR	25
VII.	RESULTADOS	37
1.	Identificación, caracterización clínica de mujeres y toma de muestra.	37
2.	Tinción de Gram de muestras de hisopado vaginal	39
3.	Extracción de DNA de muestras de hisopado vaginal	40
4.	Amplificación por PCR.	44
4.1	Amplificación de las regiones V3-V4 del gen 16s rDNA	44
4.2	Preparación de genotecas de la región V3 del gen 16S rDNA	44
4.3	Amplificación de la región V5 del gen 18S rDNA	46
4.5	Preparación de genotecas de la región V5 del gen rDNA 18S.	47
5.	Diagnóstico de especies de Cándida por amplificación con PCR	47
6.	Caracterización de la Diversidad de la Microbiota Vaginal	49
6.1	Abundancias relativas de bacterias en muestras vaginales	49
6.2	Índices de Diversidad	55
6.3	Prueba estadísticas	56
VIII.	DISCUSIÓN	58
	VALIDACIÓN DE HIPÓTESIS	64
IX.	CONCLUSIONES	64
X.	PERSPECTIVAS	66
	REFERENCIAS	68
	ANEXOS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del aparato reproductor femenino externo.	6
Figura 2. Tinción de Gram de hifas de <i>Candida</i> , células clave y trofozoíto.	7
Figura 3. Micrografía de electrones de levaduras e hifas de <i>Candida albicans</i> .	9
Figura 4. Etapas de la infección por <i>C. albicans</i> .	10
Figura 5. Porcentaje de especies positivas a lo largo de dos ciclos menstruales.	15
Figura 6. Abundancia relativa por pirosecuenciación en 79 mujeres sanas.	16
Figura 7. Abundancia relativa de bacterias en 30 mujeres.	18
Figura 8. Esquema del gen rDNA 16S de <i>E. coli</i> e iniciadores CGO465F/R.	26
Figura 9. Esquema del gen 16S rDNA de <i>E. coli</i> e iniciadores V3 341F/R Full.	27
Figura 10. Esquema del gen 18S rDNA de <i>S. cerevisiae</i> con Fwdv18S/Rev200.	29
Figura 11. Esquema del gen 18S rDNA de <i>S. cerevisiae</i> con 18SF/18S200R.	30
Figura 12. Esquema del ITS1 e ITS2 de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i> .	32
Figura 13. Esquema del gen MEX67 de <i>S. cerevisiae</i> .	34
Figura 14. Vector pPG-01.	35
Figura 15. Vector pPG-02.	35
Figura 16. Vector pPG-03.	36
Figura 17. Tinción de Gram de muestra vaginal.	40
Figura 18. Ácidos nucleicos totales.	43
Figura 19. Amplificación de las regiones V3-V4 del gen rDNA 16S.	44
Figura 20. Preparación de genoteca de la región V3 del gen rDNA 16S.	45
Figura 21. Geles preparativos de mezclas 1 y 2 de genotecas del gen rDNA 16S.	46
Figura 22. Amplificación de la región V5 del gen rDNA 18S.	46
Figura 23. Preparación de genoteca de la región V5 del gen rDNA 18S.	47
Figura 24. Diagnóstico de especies de <i>Cándida</i> por PCR.	48
Figura 25. Abundancia relativa de muestras casos y controles.	51
Figura 26. Abundancia relativa de los grupos casos, controles y VB.	52
Figura 27. Abundancia relativa de grupos de métodos anticonceptivos.	53
Figura 28. Abundancia relativa de grupos de fase del ciclo sexual.	54
Figura 29. Gráficas de 8 géneros y 2 familias de bacterias.	57
Figura 30. Gráfica de 1 género con diferencia estadísticamente significativa.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos causantes de vaginitis en la CDMX.	2
Tabla 2. Tratamiento de CVV y CVVR.	8
Tabla 3. Iniciadores para amplificación de regiones V3-V4 del gen 16S rDNA.	25
Tabla 4. Programa para amplificación de las regiones V3-V4 del gen 16S rDNA.	25
Tabla 5. Iniciadores para amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA.	27
Tabla 6. Programa para amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA.	27
Tabla 7. Iniciadores para la amplificación de la región V5 del gen 18S rDNA.	28
Tabla 8. Programa para amplificación de la región V5 del gen 18S rDNA.	29
Tabla 9. Programa para amplificación de región V5 c/barcode del gen 18S rDNA.	30
Tabla 10. Iniciadores para amplificación ITS1/ITS2 de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i> .	31
Tabla 11. Programa para amplificación ITS1 e ITS2 de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i> .	32
Tabla 12. Iniciadores para la amplificación del gen MEX67 de <i>S. cerevisiae</i> .	33
Tabla 13. Programa para la amplificación del gen MEX67 de <i>S. cerevisiae</i> .	33
Tabla 14. Características clínicas cualitativas de mujeres casos y controles.	38
Tabla 15. Características clínicas cuantitativas de mujeres casos y controles.	39
Tabla 16. Cuantificación de ácidos nucleicos totales en muestras de mujeres.	40
Tabla 17. Mujeres con presencia/ausencia de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CVV	Candidiasis Vulvovaginal
VB	Vaginosis Bacteriana
CVVR	Candidiasis Vulvovaginal Recurrente
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SNP	Polimorfismo de un sólo nucleótido
MBL	Lectina de Unión a Manosa
QS	<i>Quorum Sensing</i>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
VH2	Virus del Herpes Simple 2
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
DE	Desviación Estándar
pb	pares de bases
ACO	Anticonceptivos Orales
DIU	Dispositivo Intrauterino
OTB	Oclusión Tubárica Bilateral

RESUMEN

La candidiasis vulvovaginal es una infección del epitelio de la vagina causada por levaduras del género *Candida* spp. El 75% de las mujeres son afectadas por candidiasis vulvovaginal y el 10% de ellas padece al menos 4 episodios en un año, condición conocida como Candidiasis Vulvovaginal Recurrente. Los agentes etiológicos más comunes son *C. albicans* y *C. glabrata*. La vagina humana está colonizada por una comunidad muy diversa de microorganismos, lo que se conoce como microbiota vaginal, la cual puede tener un impacto profundo en la salud de las mujeres. Las principales bacterias que habitan la vagina de una mujer sana son las del género *Lactobacillus* spp., que se encargan de producir ácido láctico que mantiene el pH vaginal ácido. Este trabajo buscó determinar si las mujeres que padecen candidiasis vulvovaginal recurrente tienen un perfil de microbiota vaginal alterado que pudiera hacerlas más susceptibles a esta infección. Se realizó un estudio analítico, prospectivo, de casos y controles con 96 mujeres de 18 a 45 años a quienes se les tomó una muestra de exudado vaginal de la que se extrajeron ácidos nucleicos totales y se generó una genoteca a partir de la región hipervariable V3 del gen 16S ribosomal para, por medio de secuenciación masiva, identificar a los géneros bacterianos presentes en la vagina de las mujeres. Además se realizó un diagnóstico por medio de reacción en cadena de polimerasa con iniciadores específicos para las dos principales especies causantes de candidiasis vulvovaginal. En las mujeres casos se encontró una disminución de *Lactobacillus* estadísticamente significativa con respecto a las mujeres controles ($p= 0.05$) y se identificó a *C. albicans* como responsable de la infección en 2.1%, a *C. glabrata* en 80.4% y coinfección en 17.4%. En las mujeres controles se encontró 63% colonizadas por *C. albicans*, 4.3% por *C. glabrata* y 19.5% por ambas especies. Esto sugiere que las mujeres con recurrencia de infecciones por esta levadura no tienen un perfil sano de microbiota vaginal y que es probable que se vean beneficiadas de tratamientos con probióticos o prebióticos que restauren una alta abundancia de *Lactobacillus* spp. logrando mejorar su salud reproductiva.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis is an infection of the vaginal epithelium caused by yeast of the *Candida* genus. 75% of all women will experience at least one episode of this infection during their lifetime, and 10% will have at least 4 episodes in one year, condition known as recurrent vulvovaginal candidiasis. The most common etiological agents are *C. albicans* and *C. glabrata*. The human vagina is colonized by a very diverse community of microorganisms known as vaginal microbiota that has an important impact in female health. The most abundant bacteria in the normal vaginal microbiota are different species of *Lactobacillus*, which produce lactic acid that keeps an acid pH as well as bactericides and fungistatics that prevent serious infections of the female reproductive tract. Up to 55% of asymptomatic women can be also colonized by different species of *Candida*. This study determined whether the vaginal microbiota of women with recurrent vulvovaginal candidiasis is different from the one of healthy women. It was an analytical, prospective, case-control study with 96 women from 18 to 45 years of age. We took vaginal swab samples and extracted the total nucleic acids to create a genomic library based on the hypervariable region V3 of the 16S ribosomal gene to do next-generation DNA sequencing and identified the bacterial genera in our samples. We also made a molecular diagnosis of two of the most common species of *Candida* found in vulvovaginal candidiasis using specific primers in a polymerase chain reaction. We found a statistical significant loss of *Lactobacillus* ($p= 0.05$) in the cases group compared to the controls group and identified *C. albicans* as the responsible of 2.1% of the recurrent infections, *C. glabrata* in 80.4% and a coinfection in 17.4% of the cases. Interestingly, we found 63% of the asymptomatic women colonized with *C. albicans*, 4.3% with *C. glabrata*, and 19.5% with both species. These results suggest that women who suffer from recurrent vulvovaginal candidiasis do not have a healthy vaginal microbiota and that they may improve their reproductive health with the help of probiotics or prebiotics that could potentially restore the right abundance of *Lactobacillus* spp.

I. INTRODUCCIÓN

1. Candidiasis Vulvovaginal

1.1 DEFINICIÓN

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una infección o vaginitis del epitelio de la vagina y el vestíbulo ocasionada por levaduras del género *Candida*, la cual se puede extender hasta los labios menores, labios mayores y región inguinal (Secretaría de Salud, 2010).

La vaginitis infecciosa es la causa más común de consulta ginecológica e incluye tres tipos de infecciones: vaginosis bacteriana (VB), CVV y tricomoniasis, con una prevalencia de 22-50%, 17-39% y 4-35% respectivamente (Ilkit *et al.*, 2011).

La VB es una disbiosis causada por una cantidad excesiva de ciertas bacterias que cambian el equilibrio normal de la microbiota vaginal, sin que se reconozca algún agente en particular como única etiología. Se caracteriza por una disminución de *Lactobacillus* spp. y un aumento de las bacterias anaerobias de 100 a 1000 veces la cantidad normal. Técnicas de microbiología clásica han identificado bacterias asociadas a VB, incluyendo a *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Mobiluncus* spp. y *Mycoplasma hominis* (Shipitsyna *et al.*, 2013).

La presencia de cándida en la vagina en ausencia de inmunosupresión o mucosa dañada y que no se asocia con ningún síntoma o signo es llamada colonización y no es considerada enfermedad. Por otro lado, la CVV se clasifica en no complicada, caracterizada por episodios esporádicos en mujeres inmunocompetentes, y complicada, que se presenta en mujeres con factores de inmunosupresión o recurrencia de la infección. La candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR) se define como al menos cuatro episodios de CVV en un año (Achkar *et al.*, 2010).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Las infecciones genitales femeninas representan una de las primeras causas de consulta en unidades de atención médica, representando hasta un 20-55% de las consultas en atención médica primaria (Arrieta-Pérez *et al.*, 2014).

Tabla 1. Microorganismos causantes de vaginitis en un periodo de 3 años en la Ciudad de México.

ESPECIE	NÚMERO DE MUJERES	PORCENTAJE
<i>Gardnerella vaginalis</i>	985	38.13
<i>Candida sp.</i>	837	32.40
<i>Escherichia coli</i>	645	24.97
<i>Trichomona vaginalis</i>	60	2.32
<i>Staphylococcus aureus</i>	56	2.17
Total	2,583	100.00

Modificado de (Flores-Paz *et al.*, 2003).

La CVV causa aproximadamente un tercio de todos los padecimientos que cursan con síntomas de vaginitis, siendo la segunda causa de este trastorno sólo por debajo de la VB. No se considera una infección oportunista como la candidiasis oral ni tampoco una enfermedad de transmisión sexual (Sobel *et al.*, 2015).

Hasta el 90% de los casos son ocasionados por *Candida albicans*, sin embargo, otras especies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* son causa de esta enfermedad. Se estima que el 75% de las mujeres tienen al menos un episodio de CVV durante su vida y que el 10% se convertirá en CVVR (Secretaría de Salud, 2010). La incidencia de no-*albicans*, principalmente *C. glabrata*, está en auge y puede ser la causa de CVVR y resistente a tratamiento farmacológico (Reynaud A., 2007).

Se ha visto que *C. albicans* está más asociada a cuadros sintomáticos que las especies no-*albicans*, las cuales tienden a ser más resistentes a los antimicóticos o necesitan de mayores concentraciones de los mismos para lograr un tratamiento efectivo, además de estar relacionadas con la aplicación de tratamientos inadecuados (automedicación). De hecho, la erradicación de *C. albicans* puede inducir el crecimiento selectivo de especies como *C. glabrata* y *C. krusei*, resistentes a varios antimicóticos de uso común (Basso *et al.*, 2012).

Las levaduras más comúnmente aisladas de la vagina de mujeres son *C. albicans* (90%), *C. glabrata* (5 a 10%) y *C. tropicalis* (1 a 3%). Otras especies menos comunes son *C. krusei*, *C. famata* o *Saccharomyces cerevisiae* (0.5 a 2%) (Basso *et al.*, 2012).

Diferentes especies de *Candida* pueden encontrarse en el tracto genital de hasta 20% de mujeres clínicamente sanas en edad reproductiva y hasta 6% en prepuberales. Sin embargo, identificar a este patógeno no necesariamente indica enfermedad pues el diagnóstico de vulvovaginitis requiere de la presencia de inflamación (Sobel *et al.*, 2015).

En México, esta enfermedad afecta a mujeres de diferentes grupos etarios con tasas de incidencia desde 9.31 hasta 545.20 por cada 100,000 habitantes. La tasa más baja corresponde al grupo etario de preescolares y la tasa más alta al grupo etario de mujeres entre 20 y 24 años de edad (Secretaría de Salud, 2010).

Sin embargo, la prevalencia de CVV es difícil de determinar pues el diagnóstico por lo general es solamente clínico y no se confirma por cultivo, además de que existe muy fácil acceso a medicamentos antimicóticos que se venden sin receta y evitan que las mujeres acudan a consulta médica (Sobel *et al.*, 2015). Se considera que sólo 20% a 30% de las mujeres que se automedican por autodiagnóstico de CVV cursan realmente con esta infección (Reynaud A., 2007).

Datos epidemiológicos recientes sugieren que la prevalencia de CVVR puede ser hasta de un 10% de las mujeres que sufren de un primer episodio de CVV. Esto se traduce en una incidencia anual global estimada del 2% de todas las mujeres (Cassone A., 2014).

1.3 FISIOPATOLOGÍA

Existen más de 100 especies de *Candida* que son patógenas para los seres humanos. La mayoría de ellas vive como comensal en el tracto gastrointestinal, aparato reproductor y en la piel (Reynaud A., 2007).

Los mecanismos de defensa vaginales permiten que haya persistencia a largo plazo de *Candida* como comensales en una fase no virulenta. Se cree entonces que cambios en el ambiente vaginal hospedero son necesarios para que este organismo induzca efectos patológicos (Sobel *et al.*, 2007).

La CVVR se relaciona con el ciclo de los estrógenos. La mayoría de las mujeres refieren una exacerbación de los síntomas después de la ovulación y cuando los niveles estrogénicos llegan a su punto más alto, unos días antes de la menstruación, con una rápida disminución de los mismos durante la menstruación, cuando hay ausencia de estrógenos (Fischer G., 2012).

Los hallazgos clínicos suelen coincidir con estos cambios referidos. Además, se ha visto una baja incidencia en mujeres prepuberales y en posmenopáusicas. Algunos datos experimentales sugieren que una alta concentración de estrógenos aumenta el contenido de glucógeno en el epitelio vaginal, lo que le provee a la *Candida* una fuente rica de energía para su desarrollo (Fischer G., 2012).

1.4 FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo para la CVV incluyen los siguientes:

1. Uso de antibióticos: hasta un tercio de las mujeres con CVV refieren haber tomado antibióticos sistémicos en días previos, que pueden inhibir el crecimiento de la microbiota vaginal normal.
2. Inmunodepresión: las mujeres con Diabetes mellitus, tratamiento con glucocorticoides o infección por Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tienen mayor recurrencia de esta infección.
3. Niveles altos de estrógenos: existen más casos en mujeres con anticonceptivos orales, embarazadas y terapia de sustitución estrogénica.
4. Dispositivos anticonceptivos: esponjas vaginales, diafragmas y dispositivos intrauterinos han sido asociados con recurrencia de CVV.
5. Vida sexual: a pesar de que la CVV no se considera una enfermedad de transmisión sexual, pues aparece en mujeres célibes y algunas especies de *Candida* se consideran parte de la microbiota vaginal normal, se ha visto incidencia aumentada en mujeres con vida sexual activa, además de que sus parejas tienen cuatro veces más posibilidad de ser colonizados por este patógeno (Sobel *et al.*, 2015).
6. Susceptibilidad genética: existen mutaciones en genes del sistema inmune en mujeres con CVVR. (Smeekens *et al.*, 2013).

En realidad los factores que determinan qué mujer sufrirá la transición de CVV esporádica a CVVR no están bien definidos. Se cree que una pequeña fracción de los casos se debe a la persistencia de los factores de riesgo de CVV como tal, pero en la mayoría de los casos se establece como una CVVR idiopática pues son mujeres que no tienen ningún factor de riesgo conocido (Cassone A., 2014).

Esto sugiere que existe una predisposición genética a la CVVR, similar a la observada en otras infecciones por *Candida* tales como la candidiasis mucocutánea crónica. La alta incidencia de CVVR sugiere que esta predisposición involucra diferentes genes en cada mujer además de la interacción con detonadores ambientales (Cassone A., 2014).

Varios polimorfismos que predisponen a CVVR han sido reportados, incluyendo polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en genes que codifican para las siguientes proteínas:

1. Lectina de unión a manosa (MBL): se une con los carbohidratos presentes en la superficie de las células de los microorganismos patógenos, mediando la opsonización directamente o por medio de la activación del complemento por la vía de las lectinas. Estudios genéticos han demostrado que los individuos que portan una sola mutación presentan aproximadamente el 10% de los niveles de concentración y/o de actividad de la lectina de los individuos normales, mientras que los homocigóticos y heterocigóticos con más de una mutación presentan niveles de concentración y/o de actividad de la lectina extremadamente bajos o no detectables, lo cual los puede predisponer a enfermedades infecciosas (Merlín-Linares *et al.*, 2006).

2. Interleucina 4: es una citocina antiinflamatoria y profibrótica que estimula y amplifica la respuesta inflamatoria mediante la activación de la síntesis de colágeno tipo I y III por los fibroblastos y la promoción de la progresión de la fibrosis (Roselló-lletí *et al.*, 2007).

3. Interleucina 22: es un importante mediador de la respuesta inmune producido por las células T y que actúa en mucosas incluyendo la vaginal como defensa contra patógenos (Aujla *et al.*, 2009).

4. Dectina 1: la pared celular de *Candida* tiene zimosán, el cual está formado de β -Glucanos que se unen al receptor dectina 1 para internalizarse en la célula del hospedero, causando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de NF- κ B y todas las subsecuentes citosinas (Brown *et al.*, 2002).

5. Indolamina 2,3-dioxigenasa: es una enzima con capacidad de regular el sistema inmune a través de dos vías: mediante la disminución de triptófano, que es esencial para la proliferación de linfocitos T y por el efecto citotóxico de los metabolitos del triptófano (Muñiz *et al.*, 2011).

1.5 CLÍNICA

La infección comienza con síntomas como ardor, aumento del flujo vaginal que con el paso de los días se vuelve blanco tipo “requesón”, enrojecimiento de la vulva y escozor. Cuando es causado por *C. glabrata* sólo hay ardor premenstrual y poscoital ocasional (Mendling *et al.*, 2003).

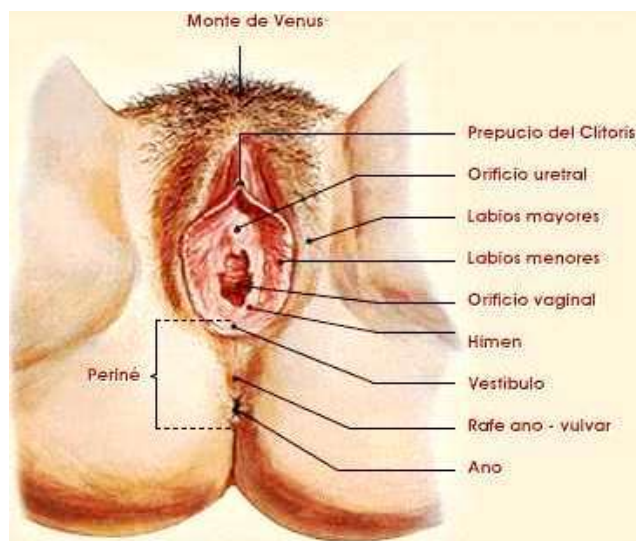


Figura 1. Anatomía del aparato reproductor femenino externo. Modificado de (Netter F., 2011).

La CVVR es una condición clínica mucho más seria debido a la recurrencia de los síntomas y por su falta de respuesta al tratamiento. Terapias a largo plazo con fluconazol pueden alargar los periodos asintomáticos pero no proveen una cura verdadera. La sintomatología de la CVVR es mucho más grave y causa un serio deterioro de la calidad de vida de las mujeres que la padecen. Además, estas mujeres suelen ser atraídas por formulaciones de venta libre que no sólo no son efectivos sino que además pueden agravar el problema (Cassone A., 2014).

El diagnóstico de CVV se puede hacer mediante varios métodos:

1. Exploración física: el flujo vaginal puede estar ausente o ser abundante, blanco, con presencia de placas en la pared vaginal, típicamente como “requesón”. Se debe sospechar candida si la mujer tiene un eritema geográfico simétrico en la vulva o en el área perineal. Este tipo de diagnóstico es aceptado para la CVV, sin embargo, una CVVR requiere de estudio a mayor profundidad.
2. pH vaginal: un pH normal (<4.5) descarta la posibilidad de VB por lo que debe buscarse la presencia de hongos en la secreción, mientras que un pH mayor a 4.5 sugiere VB o tricomoniasis.
3. Microscopía: la microscopía se usa para evidenciar la presencia de hifas, además de que se pueden ver parásitos o las “células clave” típicas de vaginosis.

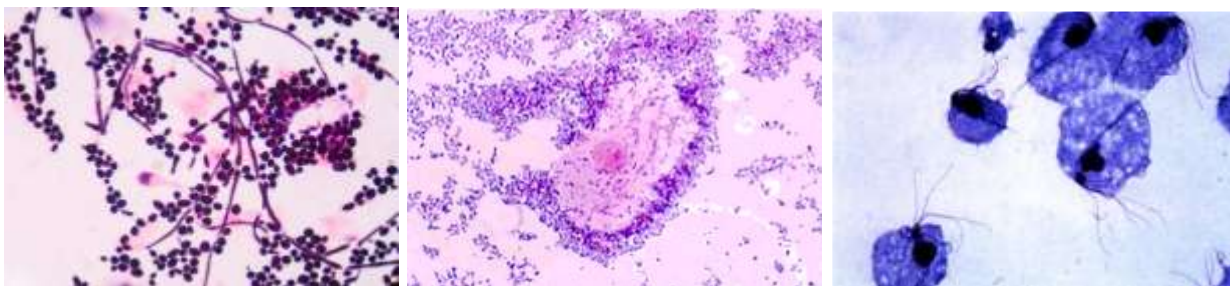


Figura 2. Tinción de Gram, aumento 400x con hifas de y levaduras de candida (izquierda) y células clave en vaginosis (centro), (Guzmán et al., 2004). Tinción de Giemsa, aumento 400X con trofozoíto ovoide de *Trichomona vaginalis* (derecha), (Carrada-Bravo et al., 2006).

4. Papanicolaou: La candida también puede ser evidenciada en frotis de las secreciones cervicovaginales con la coloración del Papanicolaou.
5. Cultivo: en agar Sabouraud o medio de Nickerson.

1.6 TRATAMIENTO

El tratamiento depende del tipo de CVV y de si la mujer se ha automedicado, en cuyo caso se preferirá la vía oral. En la Tabla 2 se mencionan los principales medicamentos utilizados.

Tabla 2. Tratamiento de CVV y CVVR.

TIPO	TRATAMIENTO
CVV no complicada	Clotrimazol: tabletas vaginales de 100mg, 1 ó 2 tabletas al día por 3 días. Nistatina: tabletas vaginales de 100,000 unidades, 1 tableta al día por 14 días.
	Fluconazol: tabletas orales de 150mg dosis única.
CVV complicada o CVVR	Fluconazol: tabletas orales de 150 mg, 1 tableta cada 72 horas 3 dosis.
	Ketoconazol: tabletas orales de 100mg, 1 tableta al día por 30 días.
	Itraconazol: tabletas orales de 200mg, 1 tableta al día por 30 días.

Modificado de (Achkar *et al.*, 2010).

2. *Candida albicans*

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Es un hongo polimórfico debido a que puede presentar morfología levaduriforme o bien, crecer como hongo filamentoso formando hifas verdaderas. Se considera un comensal oportunista que existe como parte de la microbiota del área mucocutánea, gastrointestinal y genitourinaria en el ser humano sano y coloniza las membranas mucosas del 30 a 60 % de las personas. Bajo ciertas condiciones y en el hospedero susceptible, es capaz de causar infecciones superficiales y sistémicas, siendo el hongo patógeno principal del ser humano (Rodríguez *et al.*, 2012).

Candida spp. pertenecen a la microbiota de la mucosa vaginal, sin embargo también puede ser auto-transmitida hasta la vagina a partir de la región perianal, teniendo como fuente la microbiota intestinal.

Bajo condiciones apropiadas, la levadura deja de ser simplemente colonizadora, acelerando el proceso de multiplicación y expresión de factores de virulencia, resultando en la invasión de la mucosa vaginal y ocasionando la CVV (Basso *et al.*, 2012).

2.2 FACTORES DE VIRULENCIA

Candida spp. son microorganismos eucariontes con una extraordinaria capacidad de adaptarse a diferentes ambientes y hospederos, lo que les permite tener un doble estilo de vida: como comensal y como patógeno (Cassone A., 2014).

Esta dualidad tiene una correspondencia morfológica pues *Candida* cambia de su forma típica ovoidea de levadura, que normalmente se asocia a la colonización vaginal, a un organismo que forma hifas y que se asocia con CVV o CVVR.

En la forma de levadura, *Candida* es tolerada por una gran variedad de mecanismos vaginales que evitan su transformación a hifas. Cuando estos mecanismos fallan y *Candida* forma hifas, éstas forman una biopelícula gruesa que se adhiere fuertemente a la capa más superficial del epitelio vaginal. Las hifas junto con células de inflamación, detritos celulares y flujo vaginal son los constituyentes del flujo blanco en “requesón” característico de esta infección (Cassone A., 2014).

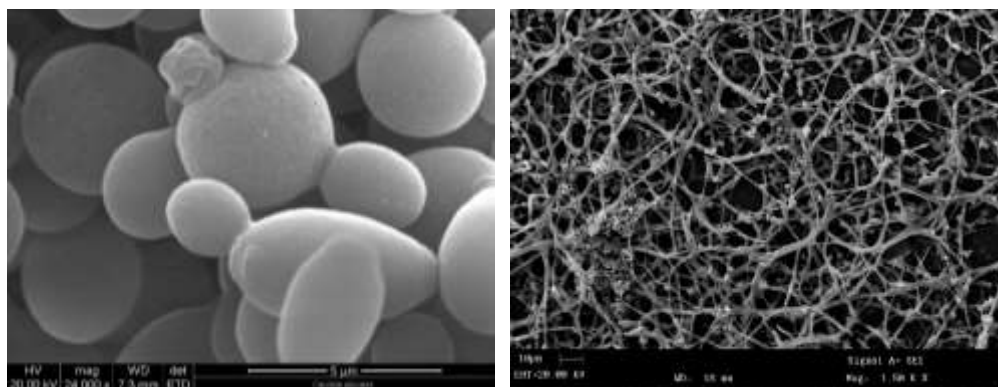


Figura 3. Micrografía de electrones de levaduras (izquierda) e hifas (derecho) de *Candida albicans* (Cassone A., 2014).

Se ha comprobado que el crecimiento de forma de hifa tiene ventajas sobre la levadura en la penetración de la célula o tejido pues es idónea para abrir la brecha entre las barreras tisulares, gracias a que su punta es el sitio de secreción de enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares. Por lo tanto, ambas formas de crecimiento podrían desempeñar un papel importante en la patogénesis y encontrarse en muchos microambientes diferentes en el huésped. La morfogénesis de levadura a hifa se revierte conforme avanza la infección y quizá sea el resultado de cambios temporales en señales que el hongo recibe de su ambiente (Castrillón *et al.*, 2005). El gen EFG1 en *C. albicans* codifica para un regulador transcripcional que tiene homologación con las proteínas PHD1 y StuA, que son las proteínas que controlan la morfogénesis en *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans*, respectivamente. Los estudios del EFG1 sugieren que es un activador transcripcional y un represor esencial para la morfogénesis de la levadura, hifa y pseudohifa (Castrillón *et al.*, 2005).

La infección puede dividirse en cuatro etapas, cada una de las cuales tiene diferentes factores de virulencia que permiten que se complete la misma:

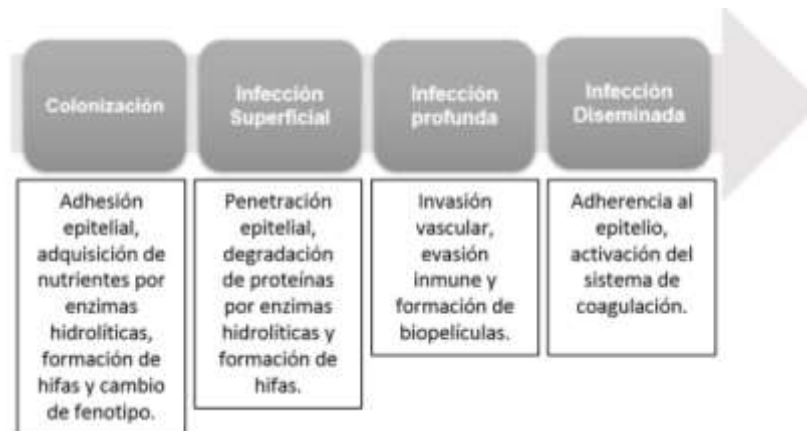


Figura 4. Etapas de la infección por *C. albicans* y los mecanismos de virulencia que intervienen en cada etapa (Rodríguez *et al.*, 2012).

Los factores de virulencia más importantes de *Candida* son los siguientes:

Adherencia

La adherencia a células del hospedero es crucial para iniciar y mantener la relación de comensal. En ella están implicados mecanismos de diferente naturaleza; unos que establecen uniones de carácter físicoquímico que acercan el patógeno a la superficie del hospedero, tal como la hidrofobicidad, y otros de naturaleza específica que implican la presencia de adhesinas y receptores en el sustrato. Las adhesinas son biomoléculas que promueven la unión a las células del hospedero e incluyen a Ala1p, Als1p y Hwp1p, Csh1, Ywp1, Pra1 y SAPs. Otras moléculas que promueven la adhesión y penetración de *C. albicans* son los polisacáridos, glicoproteínas y lípidos en su superficie celular y estructuras como las fimbrias (Rodríguez *et al.*, 2012).

Enzimas degradativas secretadas

Existen dos grandes familias de enzimas degradativas secretadas y algunos de sus miembros han sido asociados con invasión. Corresponden a las aspartil proteinasas y las fosfolipasas. Las primeras pueden estar unidas o incorporadas en la pared celular o ser secretadas y sirven para que *C. albicans* hidrolice proteínas del hospedero como colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina e inmunoglobulinas.

Perteneciendo al grupo de las fosfolipasas, se han identificado aquellas codificadas por PLA, PLB, PLC y PLD, siendo PLB1 necesaria para la virulencia e invasión ya que hidroliza las uniones de éster de glicerofosfolípidos de la membrana celular del hospedero (Rodriguez *et al.*, 2012).

Quorum sensing (QS)

Se trata del factor de virulencia que precede al cambio de morfología y a la producción de SAPs. Es un fenómeno que sirve para la comunicación entre las células y el ambiente químico y físico de su entorno.

Los sistemas regulados por QS permiten a *C. albicans* relacionarse entre sí, desarrollando un comportamiento de tipo cooperativo. *C. albicans* cuenta con varios compuestos considerados moléculas de QS como farnesol, sustancia autorreguladora morfogenética y triptofol, que bloquean la filamentación, y el tirosol, que la promueve (Rodriguez *et al.*, 2012).

Modulación de la respuesta inmune

Las proteínas de *Candida* exhiben similitudes antigénicas y funcionales a los receptores de complemento 3 y 4. Estos receptores CR3 y CR4 son análogos de integrinas. Así, debido a que *Candida* tiene receptor para estos componentes del complemento, puede evadir la fagocitosis (Rodriguez *et al.*, 2012).

Otros factores de virulencia

Durante la infección, las células de *Candida* están expuestas a ROS producidas por el sistema inmune del hospedero. Este patógeno cuenta con factores que le ayudan a neutralizar este mecanismo como catalasa, superóxido dismutasa y proteínas de choque térmico, que se encuentran sobre la superficie celular siendo regulada su expresión por el factor de transcripción Hsf1.

Además, *C. albicans* necesita hierro para lograr la colonización y proliferación dentro del hospedero, el cual consigue a través de la lisis de eritrocitos por una manoproteína de su superficie celular (Rodriguez *et al.*, 2012).

3. Microbiota vaginal

Desde hace mucho tiempo se ha reconocido que los humanos coexistimos con complejas comunidades de microorganismos que son relativamente específicas de cada localización anatómica tales como la cavidad oral, el tracto gastrointestinal o la vagina (Martin D. H., 2012).

El término “microbiota” se refiere a las comunidades de microorganismos que habitan sitios anatómicos específicos, mientras que “microbioma” indica la suma total de las bacterias que habitan el cuerpo humano y sus genomas (Martin D. H., 2012).

La microbiota que se encuentra asociada al cuerpo humano tiene una importante influencia en el desarrollo, la fisiología, la inmunidad y la nutrición de nuestros organismos. La gran mayoría de estos microorganismos existen en una relación mutualista con su huésped humano, mientras que algunos pocos son patógenos oportunistas que pueden causar tanto infecciones crónicas como enfermedades que ponen en riesgo la vida de su huésped. Estas comunidades microbianas constituyen la primera línea de defensa contra infecciones graves gracias a la competencia que ejercen con patógenos invasivos que causan enfermedades (Ma *et al.*, 2013).

Anton Van Leeuwenhoek, el padre de la microbiología e inventor del microscopio, fue el primer observador de la microbiota al observar las bacterias de su cavidad oral. Posteriormente, a inicios del siglo XIX, varios investigadores comenzaron a utilizar técnicas de cultivo bacteriano para seguir explorándola. Sin embargo, los científicos se dieron cuenta de que había varios miembros de estas comunidades que no podían ser cultivadas *in vitro*, por lo que la verdadera naturaleza de la microbiota humana quedó en la oscuridad (Ma *et al.*, 2013).

El descubrimiento de que era posible amplificar genes del DNA ribosomal 16S de bacterias directamente de muestras orgánicas y el uso de esas secuencias para identificar las especies bacterianas presentes permitió por primera vez tener descripciones precisas de la microbiota humana (Martin D.H., 2012).

Además, estos análisis moleculares evidenciaron las fallas de los métodos clásicos de microbiología para llevar a cabo estas descripciones de manera efectiva, pues se sabe ahora que hasta un 10% de los microorganismos de la mayoría de las localizaciones anatómicas del cuerpo humano no se pueden cultivar fuera del mismo (Martin D.H., 2012).

Por ejemplo, antes se pensaba que *Lactobacillus crispatus* era la especie con mayor presencia en la vagina, sin embargo, tras la aplicación de estas técnicas de biología molecular, se vio que *Lactobacillus iners*, un organismo que crece con dificultad en medios de cultivo, es la especie más prevalente (Ma *et al.*, 2013).

Los genes del DNA ribosomal 16S son los más usados para la identificación de los microorganismos que habitan el cuerpo humano pues son altamente conservados entre diferentes especies pero poseen varias regiones hipervariables que permiten la identificación de géneros o incluso especies. Para esto se generan iniciadores para las regiones conservadas y se lleva a cabo una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para obtener productos que contengan una o más de las regiones variables. Estos productos son después analizados para determinar la estructura de las comunidades bacterianas. Los métodos para lograr esto incluyen el análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción terminales, en el cual los productos de PCR se digieren con enzimas de restricción y se utilizan patrones de los fragmentos para la identificación. Otro método es la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) en el que los productos de PCR se separan basándose en diferencias en la secuencia al someterlos a la actividad de químicos con gradiente de desnaturalización (Rampersaud *et al.*, 2012).

Sin embargo, la técnica más confiable y con mejor rendimiento es la secuenciación masiva, en la que se crean genotecas con amplicones de PCR que se secuencian al mismo tiempo. Esto ha permitido aumentar de manera muy rápida el conocimiento que se tiene de las comunidades microbianas, lo que ha sido crucial para el entendimiento de la microbiota del tracto genitourinario (Rampersaud *et al.*, 2012).

La vagina humana está colonizada por una comunidad muy diversa de microorganismos, lo que se conoce como microbiota vaginal, la cual puede tener un impacto profundo en la salud de las mujeres, sus parejas sexuales y sus recién nacidos (Li *et al.*, 2012).

En 1892 Döderlein describió un microorganismo que aisló de la vagina de una mujer sana embarazada. Este organismo, al cual llamó bacilo de Döderlein, fue después llamado *Lactobacillus* (Martin D.H., 2012).

Actualmente, gracias a los métodos de caracterización de microbiota por medio de secuenciación masiva, se sabe que especies de *Lactobacillus* sp. son las bacterias dominantes de la microbiota vaginal. Sin embargo, se ha visto que una importante proporción de mujeres asintomáticas tiene un número bajo de estos bacilos y una significativa diversidad de bacterias facultativas y estrictamente anaerobias. Aun así, se cree que *Lactobacillus* sp. juega un papel determinante en la protección de la salud vaginal evitando la presencia de microorganismos nocivos. Esto se logra por medio de la producción de ácido láctico, originando un pH vaginal bajo (3.5-4.5). Se cree que la exposición de bacterias Gram negativas al pH bajo tiene efectos estimuladores en el sistema inmune innato del huésped (Ma *et al.*, 2013).

Las microbiotas vaginales que están dominadas por especies de *Lactobacillus* se han visto asociadas a bajo riesgo de infecciones del tracto reproductivo por diversos patógenos, incluyendo VIH1, Virus del Herpes Simple 2 (VHS2), *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*, además de múltiples especies de bacterias asociadas a VB (O'Hanlon *et al.*, 2013).

Ravel *et al.* en 2010 reportaron resultados de un análisis por medio de pirosecuenciación de muestras vaginales de 400 mujeres sanas. Se encontraron 5 grupos principales; 4 de estos eran dominados por *Lactobacillus*, incluyendo *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* y *L. gasseri*. El quinto grupo, llamado "grupo diverso", no era dominado por ninguno de estos *Lactobacillus* y contenía gran abundancia de microorganismos tradicionalmente asociados con vaginosis bacteriana, tales como *G. vaginalis* y *Prevotella* spp (Martin D.H., 2012).

Las fluctuaciones cíclicas de estrógeno y progesterona durante el ciclo menstrual influyen en la expresión de receptores de membrana de las células epiteliales de la vagina, la cantidad y viscosidad del moco, los niveles de glucógeno (principal sustrato para los *Lactobacillus*) e incluso la respuesta inmune vaginal, todo lo cual altera importantemente el ambiente vaginal y su microbiota. Además también existen factores exógenos que afectan la microbiota vaginal, tales como la actividad sexual, higiene personal, tabaquismo y niveles de estrés. En 2011 Lopes dos Santos *et al.* estudiaron la microbiota de 17 mujeres en edad reproductiva a lo largo de dos ciclos menstruales por medio de muestras tomadas por las mismas mujeres que se crecieron en medios de cultivo e identificaron por medio de PCRs.

Los resultados mostraron diferencias entre las especies presentes en las diferentes etapas del ciclo menstrual, que incluían a los *Lactobacillus*, quienes disminuyen considerablemente durante la menstruación (Lopes dos Santos *et al.*, 2011).

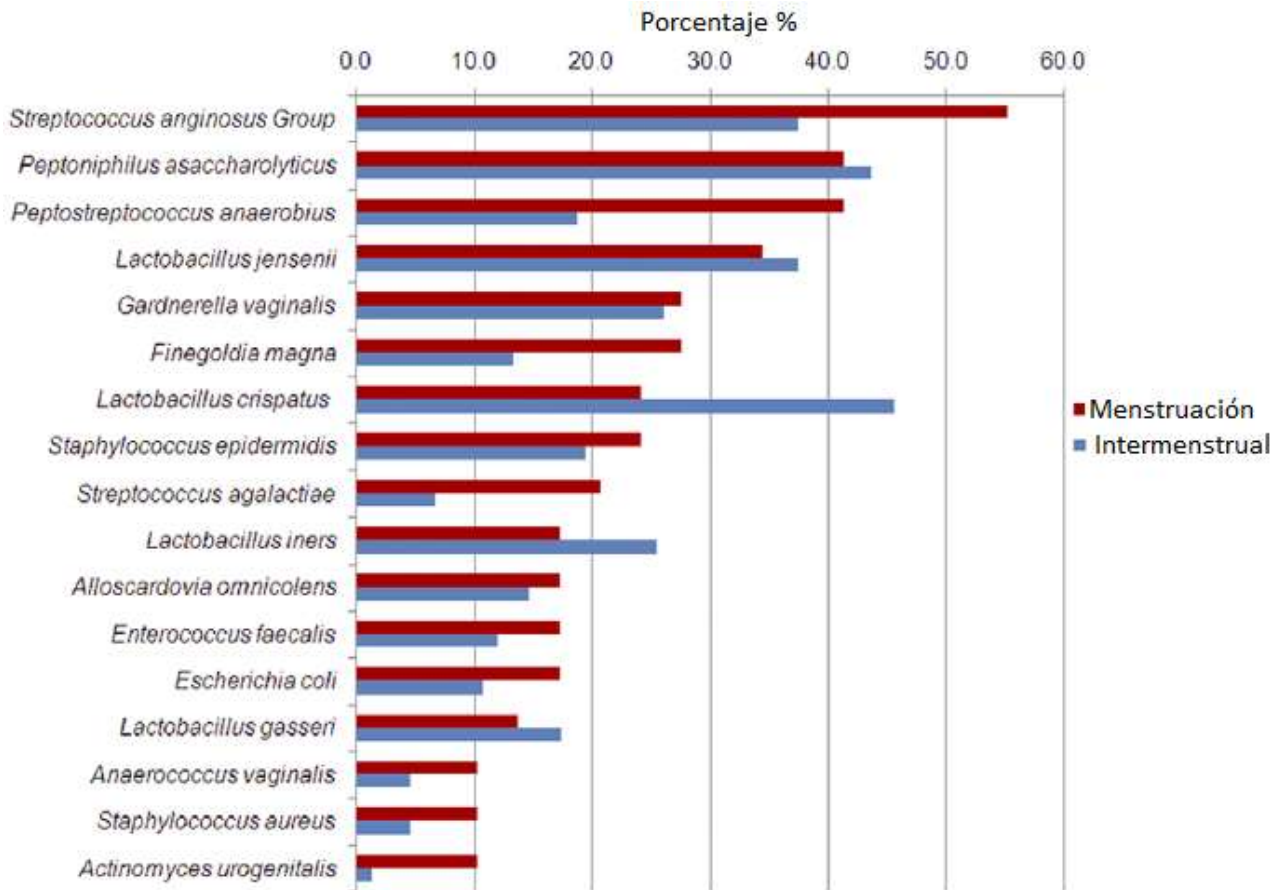


Figura 5. Porcentaje de especies positivas en cultivos de muestras recolectadas a lo largo de dos ciclos menstruales. (Modificado de Lopes dos Santos *et al.*, 2011).

La incidencia de VB varía dramáticamente entre diferentes grupos étnicos, con una incidencia de 6% en asiáticas, 9% en caucásicas, 16% en hispanas y hasta 23% en afroamericanas. No se sabe la razón de esta diferencia pues no se puede explicar por factores higiénicos, socio-demográficos o de actividad sexual. Zhou *et al.* estudiaron las diferencias en la microbiota vaginal entre 144 mujeres caucásicas y afroamericanas en el norte de Estados Unidos en 2007. Sus resultados demostraron que existe diferencia en la abundancia de distintas bacterias entre estos dos grupos, incluyendo *Lactobacillus* y especies anaeróbicas, lo cual podría explicar la mayor prevalencia de VB en las afroamericanas (Zhou *et al.*, 2007).

Posteriormente, Shipitsyna *et al.* en 2013 estudiaron la microbiota de mujeres sanas y la compararon con la de mujeres con VB. Encontraron 3 grupos. El de mujeres sanas era dominado en un 90% por *L. crispatus* y *L. iners*. El segundo grupo, el cual denominaron “intermedio”, tenía como especies dominantes a *L. iners* y a *G. vaginalis* en un 75%. Finalmente, el tercer grupo con VB tenía mayor diversidad de especies incluyendo *G. vaginalis* (29%), *Prevotella* (13%), *Megasphaera* (10%), *Atopobium vaginae* (7%), *L. amnionii* (7%), *L.iners* (7%), *S. sanguinegens* (4%) y *Eggerthella* (1%) (Shipitsyna *et al.*, 2013).

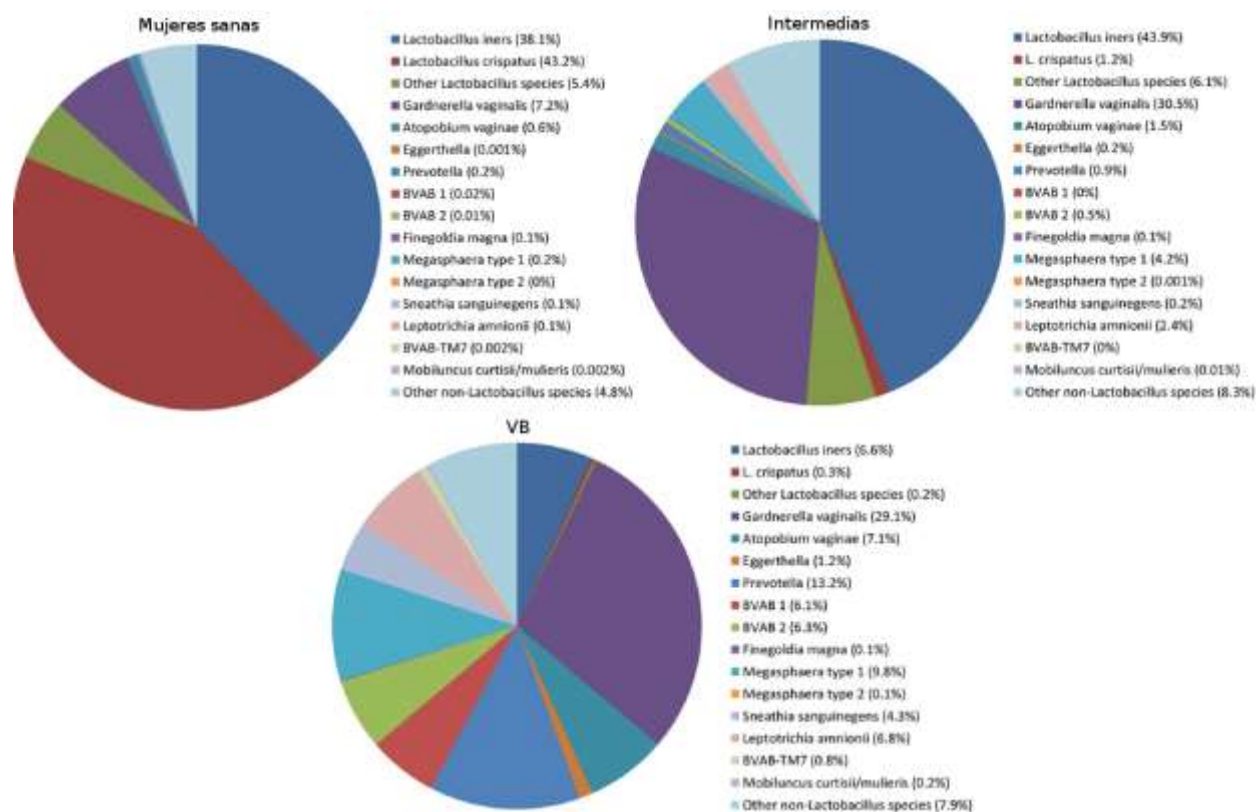


Figura 6. Abundancia relativa de 16 especies/géneros bacterianos en vagina obtenidos por pirosecuenciación en 79 mujeres sanas, 11 intermedias y 73 con VB. Modificado de (Shipitsyna *et al.*, 2013).

Se sabe que los antibióticos y los probióticos pueden recalibrar las comunidades bacterianas de la vagina. En 2015, Mayer *et al.* desarrollaron un modelo matemático para cuantificar los cambios en la cantidad de ciertas bacterias durante el tratamiento con antibióticos para el tratamiento de VB. Este estudio demostró que hay cambios rápidos en la gran mayoría de las bacterias anaerobias prevalentes de la microbiota vaginal. Por ejemplo, el tratamiento con metronidazol causa un vacío transitorio de estas bacterias que se llena por un sobrecrecimiento de *Lactobacillus iners* (Mayer *et al.*, 2015).

Cuando el tratamiento termina, las bacterias asociadas con VB reemergen rápidamente, lo que sugiere que la microbiota vaginal puede sufrir cambios dramáticos en su diversidad en intervalos extremadamente cortos (Mayer *et al.*, 2015).

4. Microbiota y Candidiasis Vulvovaginal

El papel de la microbiota vaginal en la patogénesis de la CVV es controversial en la literatura. Se sabe que la CVV es un efecto secundario común del tratamiento antibiótico de la VB, lo que indica que la microbiota está relacionada con la colonización por *Candida* (Mu-Biao *et al.*, 2013).

Existen varios estudios de la microbiota vaginal en mujeres con CVV, la mayoría de los cuales se hicieron por medio de técnicas de cultivo y microbiología clásica. En 1946, Siegler fue el primero en sugerir que la CVV está asociada con el patrón intermedio de microbiota vaginal, lo cual fue corroborado en 1992 por Hillier. Posteriormente, en 1996, Sobel y Chaim compararon la microbiota vaginal de mujeres sanas y mujeres con CVV y no encontraron diferencia en la cantidad de *Lactobacillus*, lo que sugiere que estas bacterias no juegan un papel fundamental en la protección contra el sobrecrecimiento de *Candida* (Zhou *et al.*, 2009).

En 2009, Zhou *et al.* evaluaron la microbiota vaginal de mujeres con CVV con la técnica de TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) la cual utiliza enzimas de restricción para obtener fragmentos de diferentes tamaños de DNA bacteriano y secuenciarlos. Se obtuvieron muestras de 42 mujeres, 21 sanas y 21 con CVVR, la cual se clasificó como 4 o más episodios de CVV en un periodo de 2 años. En este estudio concluyeron que las mujeres de su grupo de CVVR no tenían alteración en la microbiota vaginal con respecto a su grupo de sanas.

Sin embargo, debido a que su grupo de casos no calificaba estrictamente como CVVR pues tomaron un periodo de dos años en vez de uno, concluyeron que sus datos no eran contundentes y que más estudios y con más mujeres debían realizarse (Zhou *et al.*, 2009).

En 2013 Mu-Biao *et al.* llevaron a cabo el primer estudio de la microbiota vaginal de mujeres con CVV por medio de secuenciación masiva en una cohorte de 96 mujeres en China. Del total de las mujeres, 30 eran sanas, 39 cursaban con CVV, 16 cursaban con coinfección de CVV y VB y 10 tenían diagnóstico de VB. Los resultados mostraron a nivel de género que la microbiota del grupo de sanas es dominado por *Lactobacillus*, encontrando a dos mujeres con dominio de *Bifidobacterium* o *Streptococcus*. Por otro lado, el grupo con VB mostró mucha mayor diversidad, con una abundancia relativa de *Lactobacillus* menor y más abundancia de bacterias relacionadas con VB incluyendo a *Gardnerella*, *Atopobium*, *Dialister*, *Sneathia*, *Mobiluncus* y *Prevotella*. La estructura de la microbiota vaginal del grupo con CVV se encontró intermedia entre el grupo de sanas y el de VB, sin encontrar un patrón universal. En general, el grupo mostró mayor diversidad. El 54% de las muestras tenía un patrón similar al sano, dominado por *Lactobacillus*, mientras que el 18% tenía bajos niveles de los mismos y altos niveles de *Gardnerella*. El resto estaba en un promedio de ambos grupos. Finalmente, el grupo con coinfección CVV y VB mostró un patrón único, con un 46% de *Lactobacillus*, menor que el de las sanas pero mayor que el de VB, y una alta prevalencia de las bacterias relacionadas con VB (Mu-Biao *et al.*, 2013).

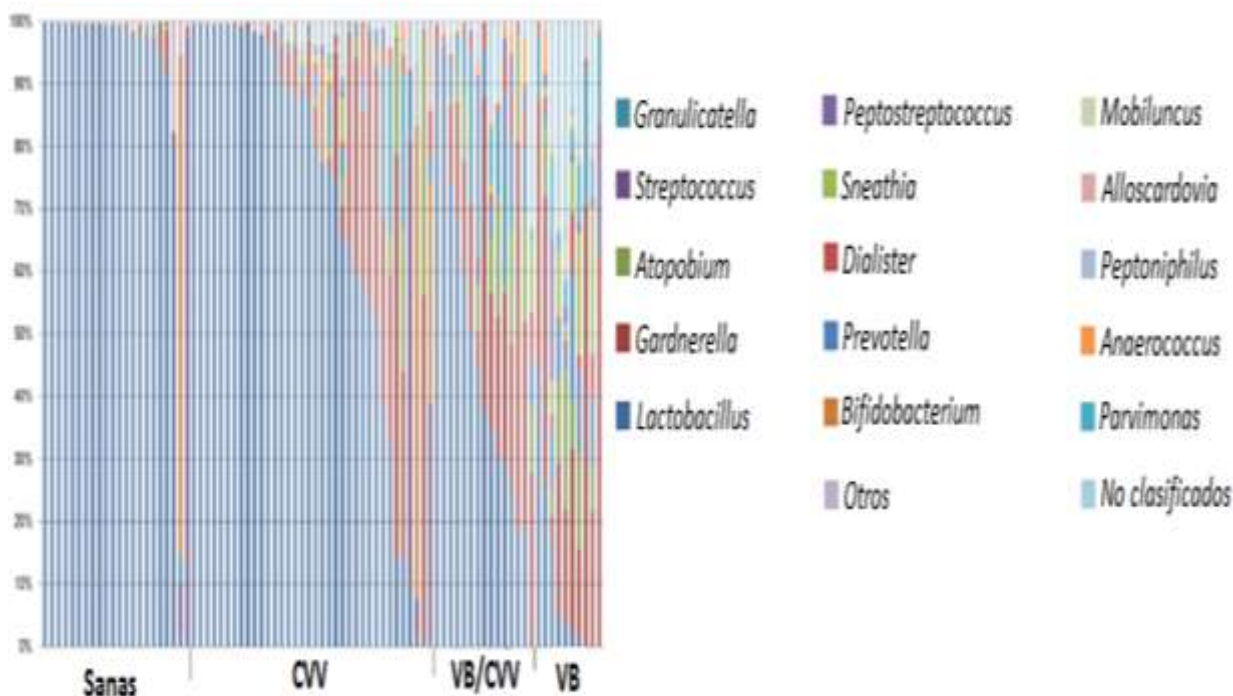


Figura 7. Abundancia relativa de 17 géneros bacterianos en vagina de 30 mujeres sanas, 39 con CVV, 16 con VB/CVV y 10 con VB. Modificado de (Mu-Biao *et al.*, 2013).

II. JUSTIFICACIÓN

La candidiasis vulvovaginal representa un problema de salud pública muy importante en nuestro país en todos los niveles socioeconómicos y puede llegar a causar complicaciones importantes y presentarse de manera recurrente, incluso durante el embarazo.

Para las mujeres que padecen de CVVR representa un problema grave que causa deterioro significativo de su nivel de vida, afectando su vida familiar y laboral, por lo que conocer los factores que las predisponen a esta recurrencia resulta de gran importancia.

Existe evidencia de que la microbiota de distintas localizaciones anatómicas juega un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de múltiples enfermedades, por lo que resulta primordial determinar si existen cambios en los microorganismos que habitan la vagina que puedan predisponer a las mujeres a padecer de manera recurrente esta infección fúngica.

Existen muy pocos estudios en la actualidad que aborden específicamente el problema de la CVVR a nivel mundial y no existe ninguna caracterización de la microbiota de mujeres mexicanas sanas o con este padecimiento.

El conocer las posibles diferencias en la microbiota vaginal de mujeres mexicanas con CVVR brinda además la oportunidad de establecer el perfil microbiano vaginal óptimo para evitar que las mujeres padezcan ésta y otras infecciones que ponen en riesgo su salud reproductiva, lo que nos permitirá en un futuro desarrollar métodos profilácticos de este padecimiento y que ofrezcan un mantenimiento adecuado de la salud de las mujeres mexicanas.

III. HIPÓTESIS

Existe un perfil microbiológico vaginal particular en mujeres con candidiasis vulvovaginal recurrente diferente al de mujeres sanas.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Demostrar que existe una diferencia en la diversidad de la microbiota vaginal de mujeres mexicanas con candidiasis vulvovaginal recurrente y la de mujeres sanas.

2. Objetivos Específicos

Objetivo específico 1: Seleccionar 50 mujeres de una cohorte de estudio con diagnóstico clínico y molecular de CVVR y 50 mujeres clínicamente sanas.

Objetivo específico 2: Caracterizar la diversidad de la microbiota vaginal de mujeres con CVVR y clínicamente sanas.

Objetivo específico 3: Determinar si existe un perfil de microbiota vaginal particular en las mujeres con CVVR.

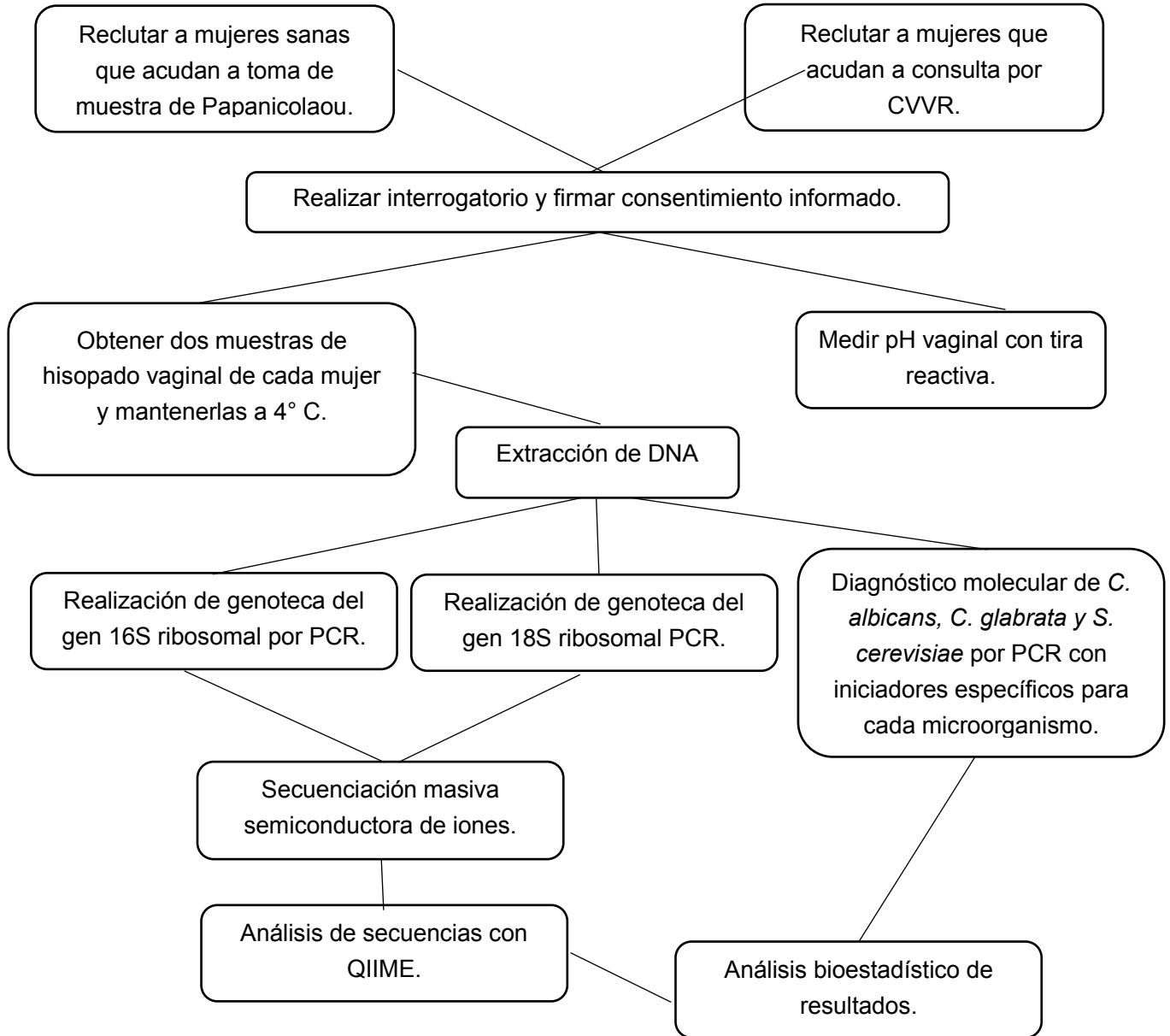
V. ALCANCE

Se establecerá la diversidad de la microbiota vaginal de 50 mujeres mexicanas con candidiasis vulvovaginal recurrente y 50 mujeres mexicanas sanas que acuden regularmente a consulta con la Dra. Yuliana Olivia Gómez Meraz del servicio de Ginecología y Obstetricia del Centro Médico ABC de la Ciudad de México por medio de secuenciación masiva semiconductora de iones.

Posteriormente se compararán ambos perfiles y se determinarán las diferencias entre ellos que podrían explicar la recurrencia de este padecimiento.

VI. METODOLOGÍA

1. Plan de trabajo



2. Diseño experimental

Muestra: Se reclutarán mujeres mexicanas que acudan a consulta ginecológica al Centro Médico ABC. Las mujeres ya conocidas por el servicio que acuden regularmente por síntomas de vaginitis y que han sido diagnosticadas con al menos 4 episodios de candidiasis vulvovaginal en un periodo de 12 meses serán consideradas para los casos, mientras que mujeres sanas que acudan a consulta anual para toma de muestra de estudio de Papanicolaou serán consideradas para los controles.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

CASOS

Mujeres mexicanas de 18 a 45 años de edad.
Haber padecido al menos 4 episodios de CVV en un periodo de 12 meses diagnosticada en el Centro Médico ABC.
No haber tenido tratamiento antibiótico vía oral o vaginal en los últimos 3 meses.
No estar menstruando.
No haber tenido relaciones sexuales 48 horas antes de la toma de muestra.
No padecer ningún trastorno inmunodepresivo.
No padecer Diabetes mellitus.
Firmar consentimiento informado previo entendimiento pleno del estudio.

CONTROLES

Mujeres mexicanas de 18 a 45 años de edad.
No tener historia de síntomas de vaginitis en los últimos 6 meses.
No haber tenido más de un episodio de vaginitis diagnosticado como candidiasis vulvovaginal a lo largo de su vida.
No haber tenido tratamiento antibiótico vía oral o vaginal en los últimos 3 meses.
No estar menstruando.
No haber tenido relaciones sexuales 48 horas antes de la toma de muestra.
No padecer ningún trastorno inmunodepresivo.
No padecer Diabetes mellitus.
Firmar consentimiento informado previo entendimiento pleno del estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

CASOS

Mujeres mexicanas menores de 18 años o mayores de 45 años de edad.
Haber padecido menos de 4 episodios de CVV en los últimos 12 meses diagnosticada en el Centro Médico ABC.
Haber tenido tratamiento antibiótico vía oral o vaginal en los últimos 3 meses.
Estar menstruando.
Haber tenido relaciones sexuales 48 horas antes de la toma de muestra.
Padecer algún trastorno inmunodepresivo.
Padecer Diabetes mellitus.
No aceptar participar en el estudio.

CONTROLES

Mujeres mexicanas menores de 18 años o mayores de 45 años de edad.
Con historia de síntomas de vaginitis en los últimos 6 meses.
Haber tenido más de un episodio de vaginitis diagnosticado como candidiasis vulvovaginal a lo largo de su vida.
Haber tenido tratamiento antibiótico vía oral o vaginal en los últimos 3 meses.
Estar menstruando.
Haber tenido relaciones sexuales 48 horas antes.
Padecer algún trastorno inmunodepresivo.
Padecer Diabetes mellitus.
No aceptar participar en el estudio.

3. Métodos.

3.1 TOMA DE MUESTRA DE HISOPADO VAGINAL

1. Acostar a la mujer en mesa ginecológica con pierneras y colocar espejo vaginal.
2. Tomar muestra con hisopo Catch All™ Sample Collection Swabs (Epicentre, Illumina) de moco cervicovaginal del fondo de saco y medir pH vaginal con tira reactiva “Hydrion” (MicroEssential).
3. Colocar hisopo en tubo de 2ml con solución PBS estéril, cortar hisopo y guardar a 4° C hasta la extracción de DNA.

3.2 EXTRACCIÓN DE DNA DE MUESTRAS DE HISOPADO VAGINAL

Extracción de DNA de las muestras de hisopado vaginal utilizando GeneAll Exgene™ Stool SV Kit (GeneAll):

1. Centrifugar los tubos con muestra vaginal por 5 minutos a 6000 rpm y desechar sobrenadante.
2. Agregar 1 ml de Buffer PBS al tubo de 2ml y agitar en vórtex por 1 minuto.
3. Incubar por 30 segundos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos y desechar el sobrenadante.
5. Agregar 1.3ml de Buffer FL y resuspender la pastilla con pipeteo.
6. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
7. Centrifugar a $\geq 10,000 \times g$ por 5 minutos.
8. Transferir el sobrenadante a la columna EzPass™ filter y centrifugar a $\geq 10,000 \times g$ por 1 minuto.
9. Transferir la columna EzPass™ filter a un tubo nuevo de 1.5ml.
10. Agregar 100µl de Buffer EB a la columna EzPass™ filter e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a $\geq 10,000 \times g$ por 1 minuto.
12. Agregar 500µl de Buffer PB al líquido que pasó y mezclar con pipeta.
13. Transferir la mezcla a la columna MiniSpin G type.
14. Centrifugar a $\geq 10,000 \times g$ por 1 minuto y desechar el líquido que pasó.
15. Agregar 500µl de Buffer NW a la columna MiniSpin G type y centrifugar a $\geq 10,000 \times g$ por 1 minuto dos veces.
16. Transferir la columna MiniSpin G type a un tubo nuevo de 1.5ml.
17. Agregar 50µl de Buffer EB al centro de la membrana de la columna MiniSpin G type e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
18. Centrifugar a $\geq 10,000 \times g$ por 1 minuto y desechar la columna.

Las muestras fueron cuantificadas con espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, E.U.) y observadas en gel de agarosa al 0.5% para corroborar la presencia e integridad de DNA.

3.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR

3.3.1 Amplificación del gen 16S ribosomal regiones V3 y V4.

Para verificar la presencia de DNA de origen bacteriano en las muestras de hisopado vaginal se llevó a cabo una PCR analítica, en la que se amplificaron las regiones polimórficas V3 y V4 del gen 16S ribosomal utilizando los iniciadores y condiciones descritas en las tablas 3 y 4, trabajando con un volumen final de 50 μ L por reacción.

Tabla 3. Iniciadores y mezcla de reacción para la amplificación de las regiones V3-V4 del gen 16S rDNA.

INICIADORES:		TAMAÑO DEL PRODUCTO:	
CGO 465F: 5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'		465 pb	
CGO 465R: 5'-CTACCAGGGTATCTAATCCTG-3'			
Mezcla de reacción			
REACTIVOS	[STOCK]	[REACCIÓN]	VOLUMEN/MUESTRA
Buffer	10x	1x	5 μ L
MgCl ₂	25 mM	2 mM	4 μ L
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 μ L
Iniciador sentido	10 μ M	0.2 μ M	1 μ L
Iniciador antisentido	10 μ M	0.2 μ M	1 μ L
Taq polimerasa	5 unidades/ μ L	0.025 unidades/ μ L	0.25 μ L
Agua	-	-	Variable
DNA	Variable	20 a 50 ng/ μ L	Variable
Volumen total		50 μ L	

Tabla 4. Programa para la amplificación de las regiones V3-V4 del gen 16S rDNA.

	TEMPERATURA	TIEMPO	
Desnaturalización inicial	95° C	5 minutos	} 25 ciclos
Desnaturalización	94° C	30 segundos	
Alineamiento	55.3° C	30 segundos	
Extensión	72° C	30 segundos	
Extensión Final	72° C	10 minutos	
	10° C	10 minutos	

Como testigo positivo para la presencia de DNA bacteriano se utilizó la cepa *Escherichia coli* SK10019 y como testigo negativo se utilizó la mezcla de reacción sin DNA molde.

La figura 8 muestra un esquema del gen 16S rDNA de *E. coli*, así como el alineamiento de los iniciadores CGO465F y CGO465R.

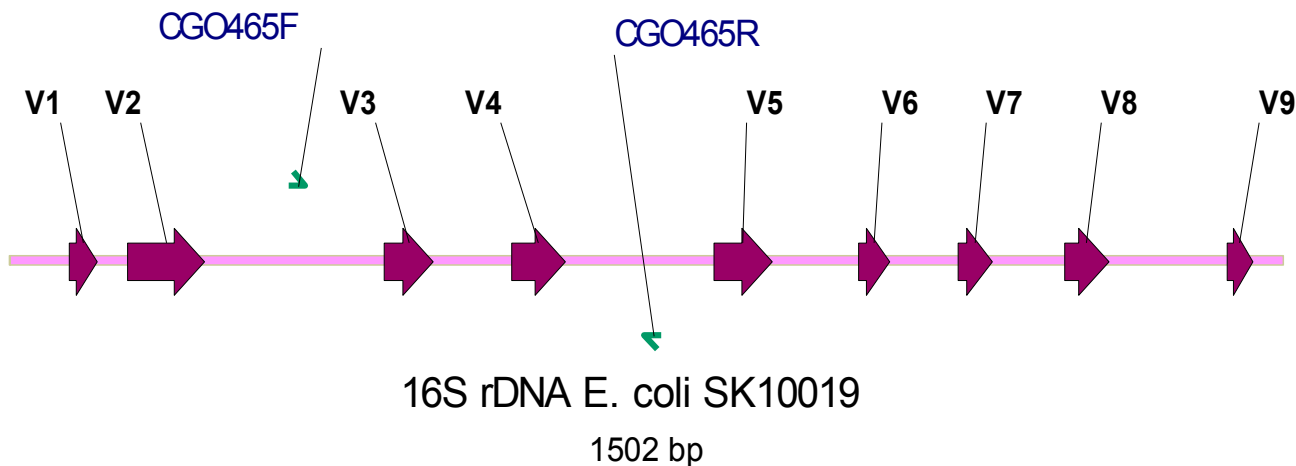


Figura 8. Esquema del gen 16S rDNA de *E. coli* SK10019 e iniciadores CGO465F y CGO465R. Se ilustra el gen 16S rDNA de *E. coli* en rosa claro, con un tamaño de 1502 pb. La secuencia y sus 9 regiones hipervariables, ilustradas en flechas rosa oscuro, fueron descritas por Brosius *et al.* en 1978. Las regiones hipervariables (V1 a V9) se ilustran en letras negras y en letras azules se ubican los iniciadores sentido (CGO465F) y antisentido (CGO465R) que se utilizaron para amplificar las regiones V3 y V4.

Las amplificaciones se hicieron en un termociclador “GeneAmp® PCR System 2700” de Applied Biosystems. Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.70 µL de colorante Midori Green Advanced (1:15) y utilizando regulador de corrida TBE, mezclando 3µL de regulador de carga y 5µL del producto de reacción. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®). Se aplicaron 90 Volts durante 50 minutos y se obtuvo la imagen en el sistema de documentación “Molecular Imager® Gel Doc™ XR” de Bio-Rad.

3.3.2 Preparación de genotecas de la región V3 del gen 16S ribosomal.

Tras demostrarse la presencia de DNA de origen bacteriano en las muestras vaginales se llevó a cabo la preparación de las genotecas del gen 16S rDNA que abarca la región polimórfica V3 con una secuencia de nucleótidos única para identificar cada muestra denominada “barcode”, además de secuencias adaptadoras necesarias en la tecnología de secuenciación masiva semiconductor de iones. Las reacciones de PCR se realizaron con las condiciones descritas en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Iniciadores y mezcla de reacción para amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA.

INICIADORES:		TAMAÑO DEL PRODUCTO:	
V3 341F: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'		281 pb	
V3 518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'			
Mezcla de reacción			
REACTIVOS	[STOCK]	[REACCIÓN]	VOLUMEN/MUESTRA
Buffer	10x	1x	5 µL
MgCl ₂	25 mM	2 mM	4 µL
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µL
Iniciador sentido	10 µM	0.2 µM	1 µL
Iniciador antisentido	10 µM	0.2 µM	1 µL
Taq polimerasa	5 unidades/µL	0.025 unidades/µL	0.25 µL
Agua	-	-	Variable
DNA	Variable	20 a 50 ng/ µL	Variable
Volumen total		50 µL	

Tabla 6. Programa para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA.

	TEMPERATURA	TIEMPO	
Desnaturalización inicial	95° C	5 minutos	
Desnaturalización	94° C	15 segundos	} 25 ciclos
Alineamiento	62° C	15 segundos	
Extensión	72° C	15 segundos	
Extensión Final	72° C	10 minutos	
	10° C	10 minutos	

La figura 9 muestra un esquema del gen 16S rDNA de *E. coli*, así como el alineamiento de los iniciadores V3 341F y V3 518R.

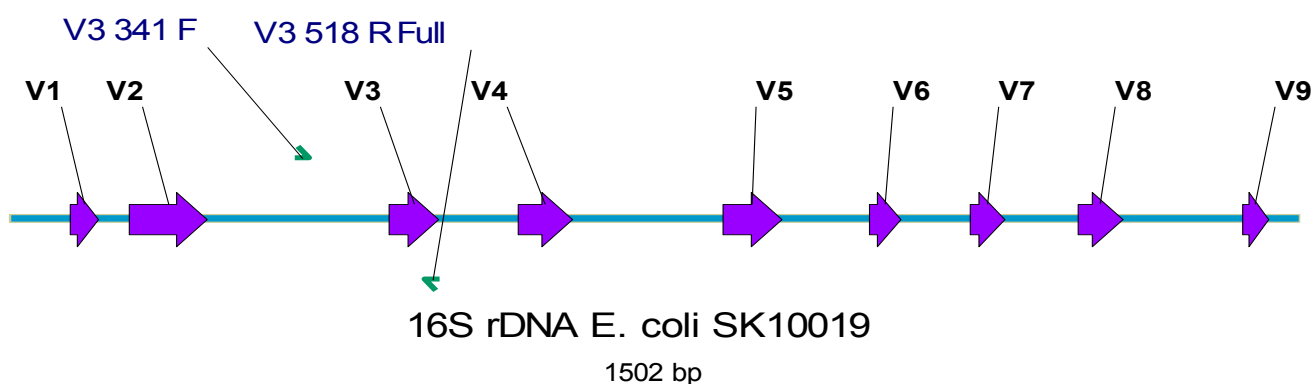


Figura 9. Esquema del gen 16S rDNA de *E. coli* SK10019 e iniciadores V3 341F y V3 518R Full. Se ilustra el gen 16S rDNA de *E. coli* en azul, con un tamaño de 1502 pb. La secuencia y sus 9 regiones hipervariables, ilustradas en flechas moradas, fueron descritas por Brosius *et al.* en 1978. Las regiones hipervariables (V1 a V9) se ilustran en letras negras y en letras azules se ubican los iniciadores sentido (V3 341F) y antisentido (V3 518R Full) que se utilizaron para amplificar la región V3.

El análisis de la calidad de los amplicones generados de cada muestra se realizó por fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 2.0% utilizando la metodología ya descrita. Después de observar que se obtuvieron los amplicones del tamaño aproximado a 281 pb, se llevaron a cabo reacciones masivas de PCR de cada muestra con la finalidad de tener mayor volumen de producto de reacción, en las condiciones y con el programa de amplificación descritos previamente.

Para preparar la genoteca de la región V3 del gen 16S rDNA se mezclaron todos los productos de PCR a una concentración equivalente y se realizó una electroforesis en gel preparativo de agarosa al 2.0%, bajo las condiciones ya descritas. Se cortó la banda correspondiente al tamaño de 281 pb y se purificó el producto de PCR utilizando el kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Por último se realizó una electroforesis en gel analítico de agarosa al 2.0% en las mismas condiciones para verificar el tamaño del producto de PCR purificado y se determinó la concentración de DNA recuperado.

3.3.3 Amplificación del gen 18S ribosomal región V5.

Para verificar la presencia de DNA de levadura en las muestras de hisopado vaginal se llevó a cabo una PCR analítica para amplificar el gen 18S ribosomal utilizando los iniciadores y condiciones descritas en las tablas 7 y 8, trabajando con la enzima de alta fidelidad Takara Ex Taq y un volumen final de 20 µL por reacción.

Tabla 7. Iniciadores y mezcla de reacción para la amplificación de la región V5 del gen 18S rDNA.

INICIADORES:		TAMAÑO DEL PRODUCTO:	
Fwdv 18S: AACGAAAGTTAGGGGATCG		300 pb	
Rev200 18S: CCACCCACAAAATCAAGAAAGAGCTC			
Mezcla de reacción			
REACTIVOS	[STOCK]	[REACCIÓN]	VOLUMEN/MUESTRA
Ex Taq Buffer	10x	0.4x	2 µL
dNTPs	10 mM	0.3 mM	1.6 µL
Primer sentido	10 µM	0.2 µM	1 µL
Primer antisentido	10 µM	0.2 µM	1 µL
Taq Takara	5 unidades/µL	0.01 unidades/µL	0.1 µL
Agua	-	-	Variable
DNA	Variable	100 ng/ µL	Variable
Volumen total			20 µL

Tabla 8. Programa para la amplificación de la región V5 del gen 18S rDNA.

	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial	95° C	5 minutos
Desnaturalización	94° C	15 segundos
Alineamiento	56° C	15 segundos
Extensión	72° C	15 segundos
Extensión Final	72° C	10 minutos
	10° C	10 minutos

} 30 ciclos

Como testigo positivo para la presencia de DNA de levadura se utilizó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* S2886 y como testigo negativo se utilizó la mezcla de reacción sin DNA molde. Las amplificaciones se hicieron y analizaron con los métodos descritos para la región V3 del gen 16S rDNA. La figura 10 muestra un esquema del gen 18S rDNA de *S. cerevisiae*, así como el alineamiento de los iniciadores Fwdv 18S y Rev200 18S.

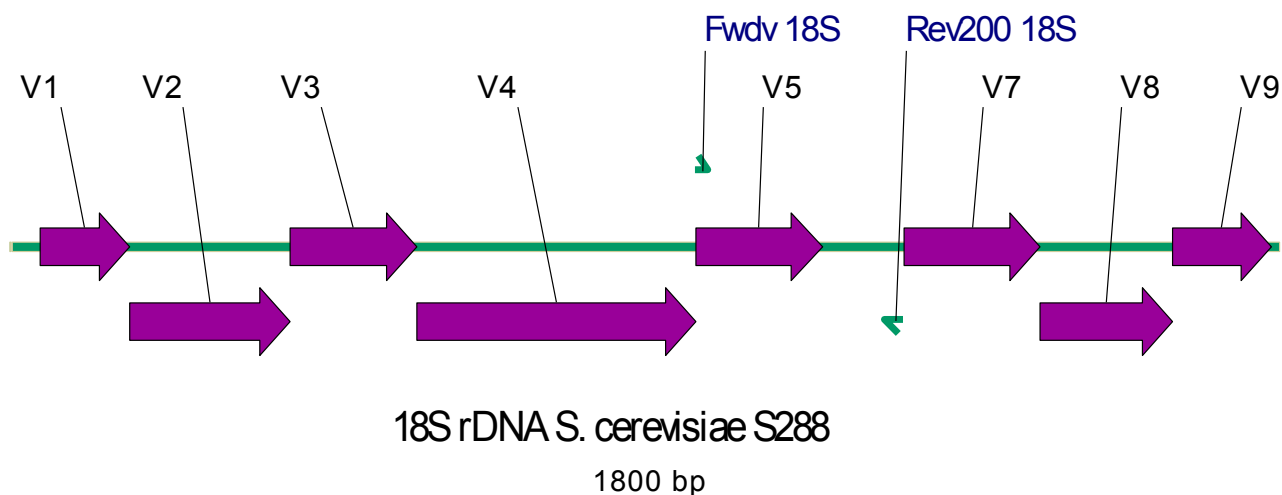


Figura 10. Esquema del gen 18S rDNA de *S. cerevisiae* S288 e iniciadores Fwdv 18S y Rev200 18S. Se ilustra el gen 18S rDNA de *S. cerevisiae* en verde, con un tamaño de 1800 pb. La secuencia y sus 9 regiones hipervariables, ilustradas en flechas moradas, fueron descritas por Hadziavdic *et al.* en 2014. Las regiones hipervariables (V1 a V9) se ilustran en letras negras y en letras azules se ubican los iniciadores sentido (Fwdv 18S) y antisentido (Rev200 18S) que se utilizaron para amplificar la región V5.

Tras demostrarse la presencia de DNA de levadura en las muestras vaginales se llevó a cabo la preparación de las genotecas del gen 18S rDNA con la secuencia de nucleótidos única “barcode”, además de las secuencias adaptadoras.

Las reacciones de PCR para obtener amplicones de 381 pb se realizaron con los mismos iniciadores y condiciones descritos en la tabla 7 agregando las secuencias barcode y con el programa de amplificación descrito en la tabla 9.

Tabla 9. Programa para la amplificación de la región V5 con barcode del gen 18S rDNA.

	TEMPERATURA	TIEMPO	
Desnaturalización inicial	95° C	5 minutos	
Desnaturalización	94° C	15 segundos	} 30 ciclos
Alineamiento	62° C	15 segundos	
Extensión	72° C	15 segundos	
Extensión Final	72° C	5 minutos	
	10° C	10 minutos	

El análisis de la calidad de los amplicones generados de cada muestra se realizó por fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 2.0% utilizando la metodología ya descrita. La figura 11 muestra un esquema del gen 18S rDNA de *S. cerevisiae*, así como el alineamiento de los iniciadores 18S F y 18S 200R.

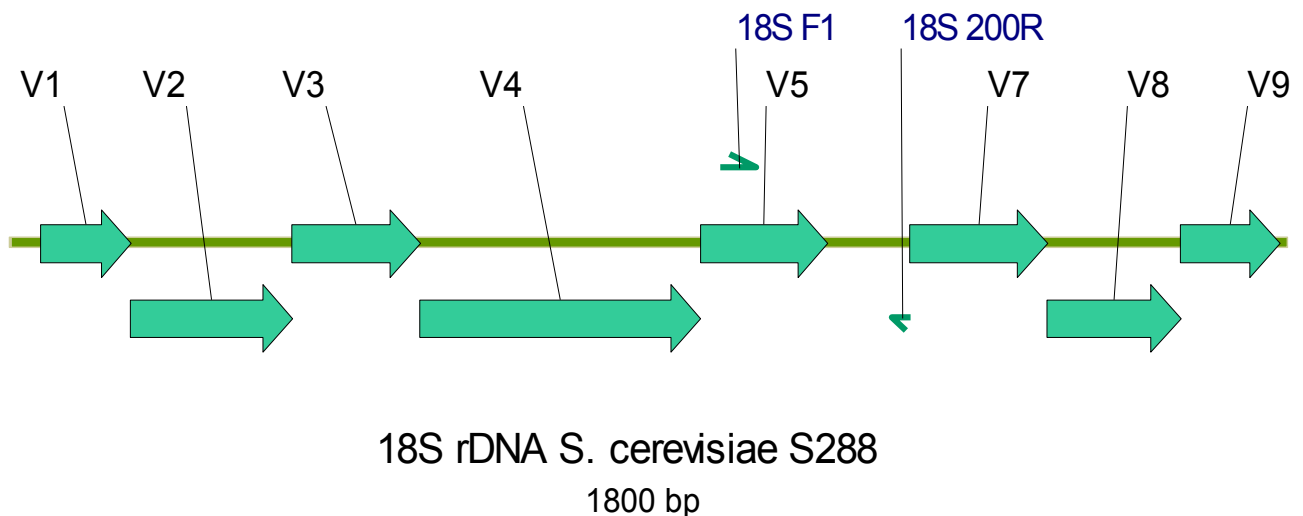


Figura 11. Esquema del gen 18S rDNA de *S. cerevisiae* e iniciadores 18SF1 y 18S 200R. Se ilustra el gen 18S rDNA de *S. cerevisiae* en verde, con un tamaño de 1800 pb. La secuencia y sus 9 regiones hipervariables, ilustradas en flechas turquesa, fueron descritas por Hadziavdic *et al.* en 2014. Las regiones hipervariables (V1 a V9) se ilustran en letras negras y en letras azules se ubican los iniciadores sentido (18S F1) y antisentido (18S 200R) que se utilizaron para amplificar la región V5.

Debido a que no se observaron los amplicones del tamaño aproximado a 381 pb, no se logró generar la genoteca del gen 18S rDNA por lo que se prosiguió a realizar diagnóstico molecular de *Cándida*.

3.3.3 Diagnóstico de especies de *Cándida* por amplificación con PCR

Para conocer la etiología de la CVVR en las mujeres casos así como la presencia de *Cándida* en las mujeres controles se realizaron reacciones de PCR utilizando iniciadores específicos para las especies *C. albicans* y *C. glabrata*.

Dichas especies fueron seleccionadas con base a la epidemiología de la infección, tomando en cuenta que son las dos especies con mayor incidencia. Además se utilizaron iniciadores para *S. cerevisiae*, pues se sabe que es uno de los microorganismos causales de vulvovaginitis diferentes a *Cándida*, y que causa un cuadro clínico prácticamente idéntico al de la CVV.

Los iniciadores para las dos especies de *Cándida* se alinean al espacio transcrito intergénico (ITS por sus siglas en inglés- *Internal Transcribed Spacer*), descritos por Luo y Mitchell en 2002. El iniciador sentido se alinea al ITS1 y el iniciador antisentido al ITS2. Estos iniciadores y las condiciones utilizadas se describen en las tablas 10 y 11, trabajando con un volumen final de 20 μ L por reacción y la enzima Takara Ex Taq de alta fidelidad.

Tabla 10. Iniciadores y mezcla de reacción para la amplificación del ITS1 e ITS2 de *C. albicans* y *C. glabrata*.

<p>INICIADORES <i>C. albicans</i>:</p> <p>CALB1: 5'-TTTATCAACTTGTCACACCAGA-3'</p> <p>CALB2: 5'-ATCCCGCCTTACCACTACCG-3'</p>	<p>TAMAÑO DEL PRODUCTO: 273 pb</p>
<p>INICIADORES <i>C. glabrata</i>:</p> <p>CGL1: 5'-TTATCACACGACTCGACT -3'</p> <p>CGL2: 5'-CCCACATACTGATATGGCCTACAA-3'</p>	<p>TAMAÑO DEL PRODUCTO: 423 pb</p>

Mezcla de reacción

REACTIVOS	[STOCK]	[REACCIÓN]	VOLUMEN/MUESTRA
Ex Taq Buffer	10x	0.4x	2 μ L
dNTPs	10 mM	0.3 mM	1.6 μ L
Primer sentido	10 μ M	0.2 μ M	1 μ L
Primer antisentido	10 μ M	0.2 μ M	1 μ L
Taq Takara	5 unidades/ μ L	0.01 unidades/ μ L	0.1 μ L
Agua	-	-	Variable
DNA	Variable	100 ng/ μ L	Variable
Volumen total		20 μL	

Tabla 11. Programa para la amplificación del ITS1 e ITS2 de *C. albicans* y *C. glabrata*.

	TEMPERATURA	TIEMPO	
Desnaturalización inicial	96° C	5 minutos	
Desnaturalización	94° C	30 segundos	} 30 ciclos
Alineamiento	58° C	30 segundos	
Extensión	72° C	30 segundos	
Extensión Final	72° C	15 minutos	
	10° C	10 minutos	

Como testigo positivo para la presencia de DNA se utilizó *C. albicans* cepa ATCC y *C. glabrata* CBS138 para sus respectivos iniciadores, y como testigo negativo se utilizó la mezcla de reacción sin DNA molde. La figura 12 muestra un esquema del alineamiento de ambos pares de iniciadores con el ITS1 y 2 de su respectiva especie.

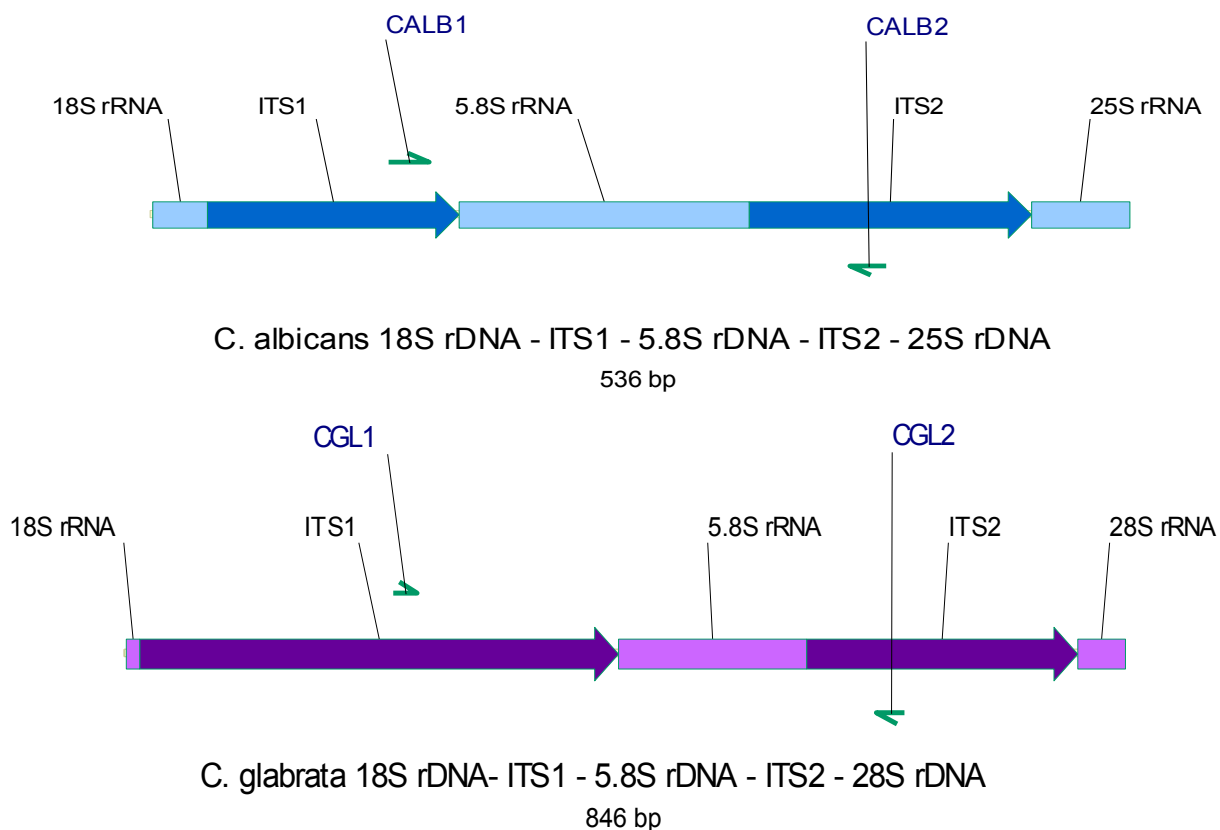


Figura 12. Esquema del ITS1 e ITS2 de *C. albicans* y *C. glabrata*. Los ITS de *C. albicans*, que se ilustran en flechas azul oscuro y los genes rDNA 18S, 5.8S y 28S en barras azul claro, fueron descritos por Williams en 1999, con un tamaño de 536pb. En letras azules se localizan los iniciadores CALB1 complementario a las posiciones 131-135 y CALB2 complementario a las posiciones 384-403. Los ITS de *C. glabrata*, que se ilustran en flechas moradas y los genes rDNA 18S, 5.8S y 28S en barras violetas, fueron descritos por Zhao en 2015, con un tamaño de 846pb. En letras azules se localizan los iniciadores CGL1 complementario a las posiciones 228-247 y CGL2 complementario a las posiciones 637-660.

Los iniciadores para *S. cerevisiae* amplifican el gen MEX67, cuya proteína participa en el transporte nuclear de mRNA. Estos iniciadores, descritos por Muir *et al.* en 2011, y las condiciones utilizadas se describen en las tablas 12 y 13, trabajando con un volumen final de 20 μ L por reacción y la enzima Takara Ex Taq de alta fidelidad.

Tabla 12. Iniciadores y mezcla de reacción para la amplificación del gen MEX67 de *S. cerevisiae*.

INICIADORES:	TAMAÑO DEL PRODUCTO:
ScerF2: 5'- GCGCTTTACATTACAGATCCCGAG-3'	150 pb
ScerR2: 5'- TAAGTTGGTTGTCAGCAAGATTG-3'	

Mezcla de reacción

REACTIVOS	[STOCK]	[REACCIÓN]	VOLUMEN/MUESTRA
Ex Taq Buffer	10x	0.4x	2 μ L
dNTPs	10 mM	0.3 mM	1.6 μ L
Primer sentido	10 μ M	0.2 μ M	1 μ L
Primer antisentido	10 μ M	0.2 μ M	1 μ L
Taq Takara	5 unidades/ μ L	0.01 unidades/ μ L	0.1 μ L
Agua	-	-	Variable
DNA	Variable	100 ng/ μ L	Variable
Volumen total		20 μ L	

Tabla 13. Programa para la amplificación del gen MEX67 de *S. cerevisiae*.

	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94° C	5 minutos	
Desnaturalización	94° C	1 minuto	} 30 ciclos
Alineamiento	58° C	1 minuto	
Extensión	72° C	1 minuto	
Extensión Final	72° C	5 minutos	
	10° C	5 minutos	

Como testigo positivo para la presencia de DNA se utilizó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* S2886 y como testigo negativo se utilizó la mezcla de reacción sin DNA molde.

La figura 13 muestra un esquema del gen MEX67 y el alineamiento de los iniciadores ScerF2 y ScerR2.

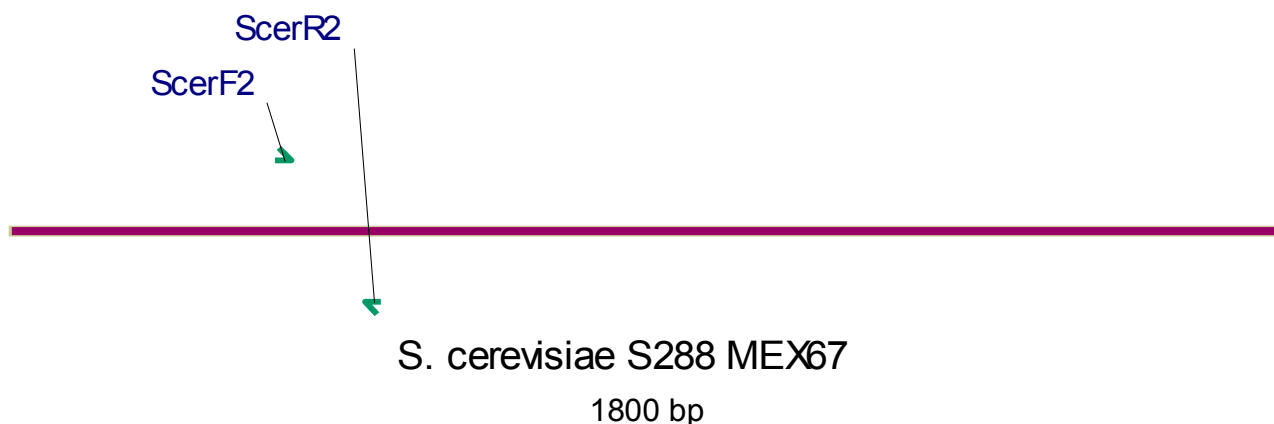


Figura 13. Esquema del gen MEX67 de *S. cerevisiae*. Se ilustra el gen MEX67 de *S. cerevisiae* en rojo, con un tamaño de 1800 pb, así como los iniciadores ScerF1 y ScerF2.

Las amplificaciones con los tres pares de iniciadores se hicieron en un termociclador “GeneAmp® PCR System 2700” de Applied Biosystems. Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.70 µL de colorante Midori Green advanced (1:15) y utilizando regulador de corrida TBE, mezclando 3µL de regulador de carga y 5µL del producto de reacción. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®). Se aplicaron 90 Volts durante 50 minutos y se obtuvo la imagen en el sistema de documentación “Molecular Imager® Gel Doc™ XR” de Bio-Rad.

Para corroborar que los productos de PCR obtenidos a partir de los tres pares de iniciadores específicos para *C. albicans*, *C. glabrata* y *S. cerevisiae* fueran las secuencias esperadas se procedió a clonarlos utilizando el GeneJET™ PCR Cloning Kit de la casa comercial Fermentas. Se aisló una clona de cada producto de PCR y se llevó a cabo la extracción de plásmido por lisis alcalina, para después llevarlo a secuenciación por capilar, utilizando los iniciadores pJET1 Forward – pJET1 Reverse. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el programa y VECTOR NTI Advance™ 11.0. Tras delimitar la secuencia consenso de los productos con el iniciador sentido y antisentido de los tres microorganismos se llevó a cabo un alineamiento tipo BLAST para asegurar la especificidad para el diagnóstico específico de cada levadura. En las figuras 14, 15 y 16 se muestra el vector pJET1.2blunt con las secuencias de los productos de PCR.

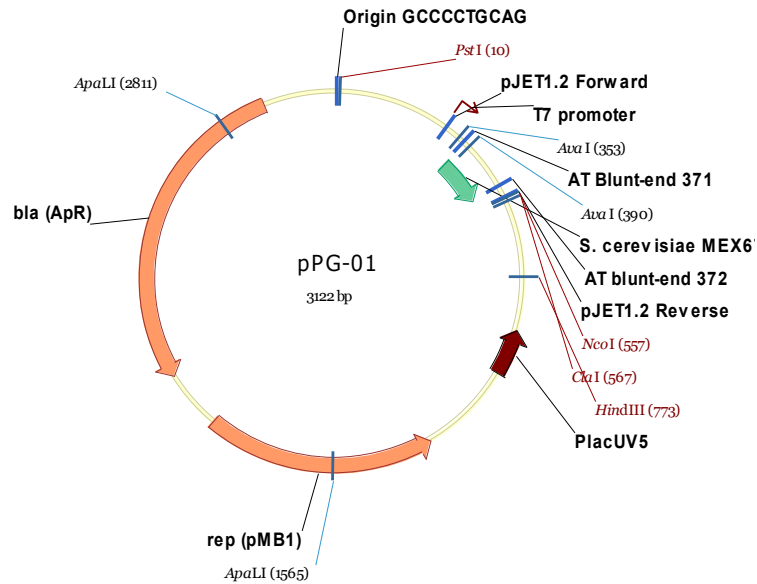


Figura 14. Vector pPG-01. Vector derivado de pJET1.2 blunt que contiene el producto de PCR de los iniciadores ScerF2 y ScerR2 descritos por Muir *et al.* en 2011, que amplifican el gen MEX67 de *S. cerevisiae* de 150pb. En flecha verde se localiza dicho amplicón entre las posiciones 371 y 372 del vector.

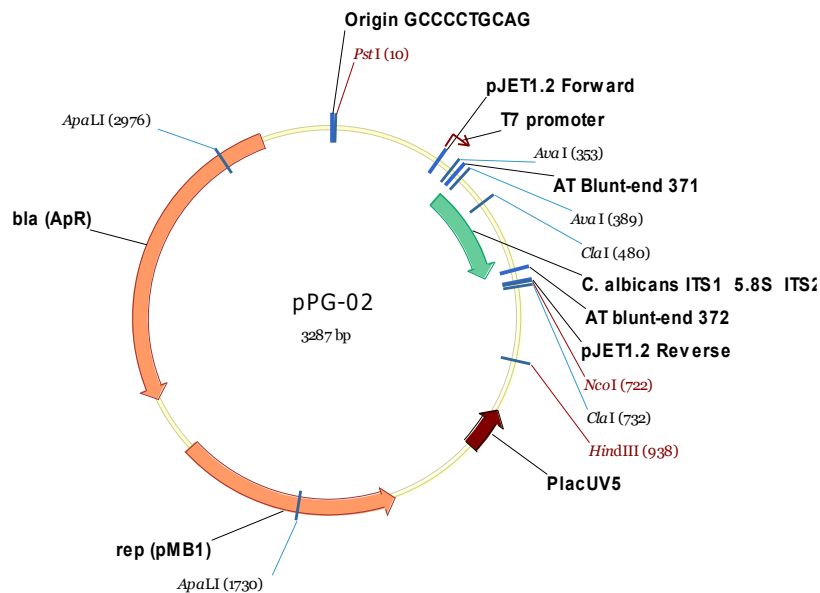


Figura 15. Vector pPG-02. Vector derivado de pJET1.2 blunt que contiene el producto de PCR de los iniciadores Calb1 y Calb2 descritos por Luo *et al.* en 2002, que amplifican las regiones ITS1 e ITS2 de *C. albicans* de 273pb. En flecha verde se localiza dicho amplicón entre las posiciones 371 y 372 del vector.

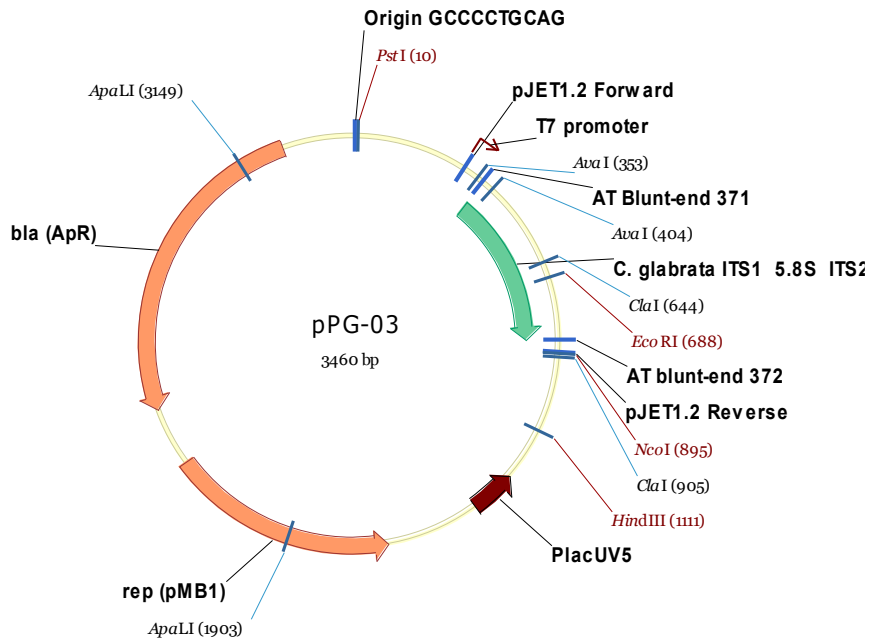


Figura 16. Vector pPG-03. Vector derivado de pJET1.2 blunt que contiene el producto de PCR de los iniciadores Cgl1 y Cgl2 descritos por Luo *et al.* en 2002, que amplifican las regiones ITS1 e ITS2 de *C. glabrata* de 273pb. En flecha verde se localiza dicho amplicón entre las posiciones 371 y 372 del vector.

3.4 Caracterización Metagenómica de la Microbiota Vaginal.

La genoteca de muestras vaginales fue analizada y acondicionada para la secuenciación masiva semiconductor de iones por el personal capacitado del Laboratorio de Referencia y Apoyo para la Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas siguiendo los siguientes pasos:

1. Verificar el tamaño de los amplicones de la genoteca utilizando equipo Bioanalyzer.
2. Acondicionar las esferas para hacer reacciones de PCR masivas.
3. Verificar la calidad de las esferas con la muestra a secuenciar utilizando equipos Ion OneTouch™ System y fluorómetro Qubit® 2.0.
4. Secuenciación de muestras con obtención de señales por flujo y por ciclo en equipo Ion Torrent PGM™ Sequence utilizando “Ion Semiconductor Sequencing Chip” 318 r con una capacidad de más de 100 Mb y una lectura de 400 pb.
5. Convertir las señales en lecturas de bases y analizar la calidad del proceso y las lecturas obtenidas.

6. Generar archivos de cada muestra de acuerdo a la lista de barcodes empleados en formato FASTQ utilizando el “software Torrent Suite v4.4.3”, excluyendo del análisis las lecturas que no cumplieron con estándares de calidad establecidos.

3.5 Análisis de resultados.

Los archivos FASTQ fueron transformados a archivos FASTA para su análisis en QIIME v1.9.0. Las secuencias se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) con un 97% de similitud, utilizando el algoritmo UCLUST.

Las quimeras se eliminaron del análisis usando ChimeraSlayer y la asignación taxonómica se realizó por el alineamiento de las secuencias contra la base de datos Green Genes.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor en Minitab versión 17 para cada una de las características clínicas con respecto a la presencia de *Candida* spp. para determinar su papel como factor de riesgo y para determinar diferencias entre los dos grupos de estudio.

VII. RESULTADOS

1. Identificación, caracterización clínica de mujeres y toma de muestra.

Se reclutó un total de 100 mujeres, 47 casos y 53 controles, de la consulta ginecológica del Centro Médico ABC de la Ciudad de México, a quienes se les realizó un cuestionario incluyendo nombre, edad, número de CVV en el último año, método anticonceptivo, fecha de última menstruación, menarca, inicio de vida sexual y número de parejas sexuales, número de gestas, partos, cesáreas o abortos, tabaquismo, última toma de antibióticos o antimicóticos y síntomas característicos de CVVR incluyendo prurito, flujo, disuria o dispareunia. Una de las mujeres casos y 7 de las controles fueron excluidas del estudio por referir haber tomado antibiótico 1 mes antes de la toma de muestra, por lo que la muestra final fue de 92 mujeres, 46 casos y 46 controles. Tras la firma de consentimiento informado y aviso de privacidad de datos, se tomó la muestra vaginal con la técnica previamente descrita.

Cada muestra se etiquetó con la clave de la mujer, que consiste de las tres o cuatro iniciales de nombres y apellidos y un número consecutivo del 1 al 100. Por último, se realizó la toma de pH vaginal con tira reactiva.

Las características clínicas cualitativas de las mujeres se resumen en la tabla 14 y las cuantitativas en la tabla 15. El test de ANOVA determinó que no había diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio con respecto a estas variables, con excepción del número de CVV en el último año y la presencia de síntomas de vaginitis ($p = 0.001$), lo que confirma una muestra homogénea entre ambos grupos.

La media de edad de las mujeres casos fue de 34.12 años y de 31 años para las controles. La media de pH vaginal en las mujeres casos fue de 4.46 y de 4.37 en las mujeres controles ($p = 0.1$).

Tabla 14. Características clínicas cualitativas de mujeres casos y controles.

		CASOS (46)	CONTROLES (46)
Método Anticonceptivo $p = 0.61$	Ninguno	54.35%	40.42%
	Preservativo	17.39%	19.14%
	DIU	4.35%	6.38%
	ACO	2.17%	17.02%
	Anillo vaginal	6.52%	10.63%
	OTB	15.22%	4.25%
	Implante	0.00%	2.12%
Etapa Ciclo Menstrual $p = 0.38$	Folicular	26.09%	34.09%
	Ovulación	10.87%	11.36%
	Lútea	63.04%	54.55%
Promiscuidad $p = 0.21$	No	69.57%	56.82%
	Sí	30.43%	43.18%
Tabaquismo $p = 0.14$	Positivo	63.04%	77.27%
	Negativo	36.96%	22.73%
Síntomas $p = 0.01$	No	15.22%	100.00%
	Sí	84.78%	0.00%

En los casos, 12 mujeres estaban en la etapa folicular del ciclo sexual, 5 en la etapa de ovulación y 29 en etapa lútea. De ellas, 29 mujeres negaron tabaquismo y 17 fuman. Sólo 7 mujeres casos refirieron no tener síntomas de vaginitis, mientras que 39 tenían al menos dos síntomas. En cuanto a uso de anticonceptivos, 25 negaron su uso, 8 usan preservativo, 2 tienen dispositivo intrauterino, 3 toman anticonceptivos orales, 1 usa anillo vaginal y 7 tienen oclusión tubárica bilateral.

Tabla 15. Características clínicas cuantitativas de las mujeres casos y controles.

		CASOS (46)	CONTROLES (46)
Edad 18 a 45 años ($p = 0.08$)	Media	34.12	31.00
	DE	7.90	7.00
pH vaginal ($p = 0.10$)	Media	4.46	4.37
	DE	0.62	0.44
Gestas ($p = 0.07$)	Media	1.95	1.29
	DE	2.09	1.50
Partos ($p = 0.37$)	Media	0.89	0.68
	DE	1.27	1.17
Cesáreas ($p = 1.06$)	Media	0.65	0.40
	DE	0.92	0.87
Abortos ($p = 0.35$)	Media	0.40	0.20
	DE	1.37	0.59
CVV en el último año ($p = 0.001$)	Media	4.12	0.00
	DE	<i>nd</i>	<i>nd</i>

Por otro lado, en cuanto a las mujeres controles, 17 estaban en etapa folicular del ciclo sexual, 5 en ovulación y 24 en etapa lútea. 35 negaron tabaquismo y 11 refirieron fumar. Todas las mujeres del grupo control se refirieron sin síntomas de vaginitis. 18 no usan ningún anticonceptivo, 9 usan preservativo, 3 tienen dispositivo intrauterino, 8 toman anticonceptivos orales, 5 tienen anillo vaginal, 1 tiene implante hormonal y 2 tienen oclusión tubárica bilateral.

Ninguna mujer que entró al estudio había tomado antibióticos en los 3 meses previos a la toma de la muestra y sólo 3 mujeres casos refirieron haberse aplicado antimicóticos vaginales en los últimos 3 meses, incluyendo nistatina y fluconazol.

2. Tinción de Gram de muestras de hisopado vaginal

Se realizó una tinción de Gram a dos muestras de hisopado vaginal de mujeres controles para observar la presencia de bacterias. La mujer de la muestra A refirió haber recibido 5 dosis de ceftriaxona vía intramuscular 15 días antes de la toma de la muestra debido a una infección de vías urinarias, mientras que la mujer de la muestra B refirió no haber tomado antibióticos por ninguna vía tres meses antes.

En la Figura 17 se muestran fotografías de microscopía óptica de las tinciones de ambas muestras, donde se observa una muy pobre presencia de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas en la mujer A y una gran presencia de bacterias en la mujer B, razón por la cual se confirmó la necesidad de excluir a mujeres con tratamiento antibiótico reciente (menos de un mes) de nuestro estudio.

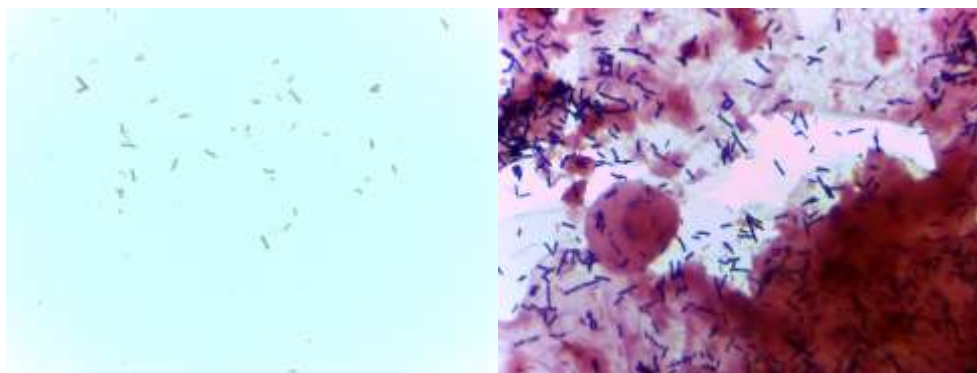


Figura 17. Tinción de Gram de una muestra vaginal de mujer control sin tratamiento antibiótico en los últimos 3 meses en la que se observan múltiples bacilos Gram positivos y de una mujer control con 3 dosis de ceftriaxona dos semanas antes de la toma de la muestra donde no se observan bacilos Gram positivos.

3. Extracción de DNA de muestras de hisopado vaginal

Se extrajeron ácidos nucleicos totales de las 92 muestras de hisopado vaginal de las mujeres casos y controles, cuya integridad se observó en geles de agarosa al 0.5% tal y como se ejemplifica en la Figura 18. Las cuantificaciones realizadas en espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, E.U.) se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Cuantificación de ácidos nucleicos totales en muestras de mujeres.

MUESTRA	A260/280	ng/ μ L
GSE01	1.99	56.2
CRJ02	1.9	23.6
SGR03	1.89	51.9
DVG04	1.88	21.9
CSS05	1.85	33.3
AEG06	2.84	6.5
DVR07	1.96	18.3
SCG08	1.85	234.9
AFB09	1.75	109.6
PLR10	1.18	24.9

SR11	1.89	36.1
GAS12	1.88	11
SRA13	2.04	165.1
LDA14	2.13	3.9
ECG15	1.85	156.7
SPHG16	1.92	13.7
NVG17	1.86	24.4
AGA18	1.91	23.2
AIM19	1.95	5.7
GNT20	1.88	63.5
ADPR21	1.87	42.8
VHS22	1.91	27.4
MDRM23	1.91	21.3
VAN24	2.7	2.69
RMS25	1.88	31.3
BFS26	1.88	42.7
MAPG27	1.85	115.8
LDD29	1.87	244.5
SMH30	1.91	18.2
MIRE31	2.9	16.2
SRG32	1.97	11.2
LVP33	1.91	37.5
GRG34	1.99	5.6
PSC35	1.88	64.5
VMG36	2.05	27.8
BACM37	2.89	33.9
CMH38	1.95	13
NLRP40	1.92	29.1
JDH41	1.93	30.4
TFL43	1.85	123
ALHM44	1.95	12.9
MALA45	1.85	54.5
LDF46	1.79	48.2
APR47	1.86	123.8

RMMF49	2.01	10.1
SAO50	1.85	21.4
YVM51	2.04	7.7
BRA52	1.89	40.2
ECM53	1.86	160.7
ACM54	1.9	20.6
FBM55	1.81	189.3
KTS56	1.87	18.8
MAD57	1.89	13.2
AFR58	1.95	11.5
MFAC59	2.2	3.9
AMB60	1.89	98.8
VRO61	1.86	86.9
DLA62	1.89	37
MFR63	1.91	24.2
VAR64	0.81	3
MMZ65	1.6	13.4
MRC68	1.96	5
JFM69	1.84	95.6
EFP70	1.85	97.5
JPD71	1.88	37.1
LGO72	1.82	54.2
AMR73	1.91	40.5
ACC74	2.04	11.3
AQG75	1.92	17.5
ICT76	1.88	17.7
PSMA77	1.97	8.7
LMS78	1.83	27.2
CCR79	1.83	68
RPM80	1.86	33.8
LCLM81	1.85	31.3
VDRS82	1.88	26.9
AVS83	1.84	26.7
ECGA84	1.88	35.4

MEPS85	1.87	93.4
MTF86	1.89	30.8
RNV87	1.87	23.4
MCSG88	1.89	35.7
MMOL89	1.88	41.4
MGM90	1.88	40.2
MAA91	2.04	7.3
GLDA94	1.88	61.5
DMCB95	1.9	66.1
AER96	1.91	29.8
LVR100	1.87	54.2
MARM51b	1.91	36.1
LVR100	1.9	54.4

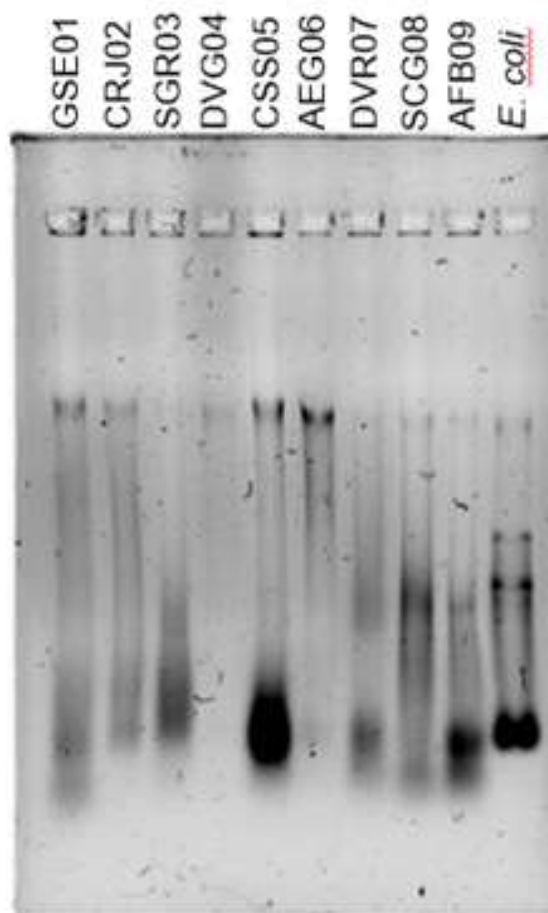


Figura 18. Ácidos nucleicos totales. Se observa un gel de agarosa al 0.5% donde se muestran los ácidos nucleicos totales de 9 muestras de mujeres casos y de *E. coli*.

4. Amplificación por PCR.

4.1. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES V3-V4 DEL GEN 16S rDNA

Se amplificaron las 92 muestras de mujeres casos y controles usando el par de iniciadores CGO464F y CGO465R, cuyos amplicones de 465 pb se observaron en geles de agarosa al 1.5% como se ejemplifica en la Figura 19.

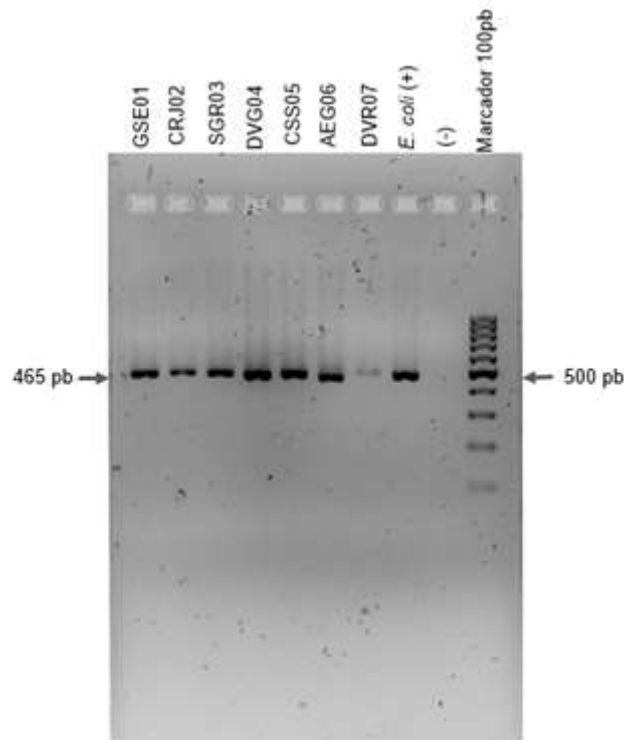


Figura 19. Amplificación de las regiones V3-V4 del gen 16S rDNA. Se observa un gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los amplicones de PCR con iniciadores CGO465F y CGPO465R con tamaño de 465pb de 7 muestras de mujeres casos, de *E. coli* como control positivo y el control negativo sin DNA molde.

4.2. PREPARACIÓN DE GENOTECAS DE LA REGIÓN V3 DEL GEN 16S rDNA

Una vez confirmada la presencia de DNA bacteriano en cada muestra se amplificaron las 92 muestras de mujeres casos y controles usando el par de iniciadores V3 341F y V3 518R, cuyos amplicones de 281 pb se observaron en geles de agarosa al 1.5% como se ejemplifica en la Figura 20.

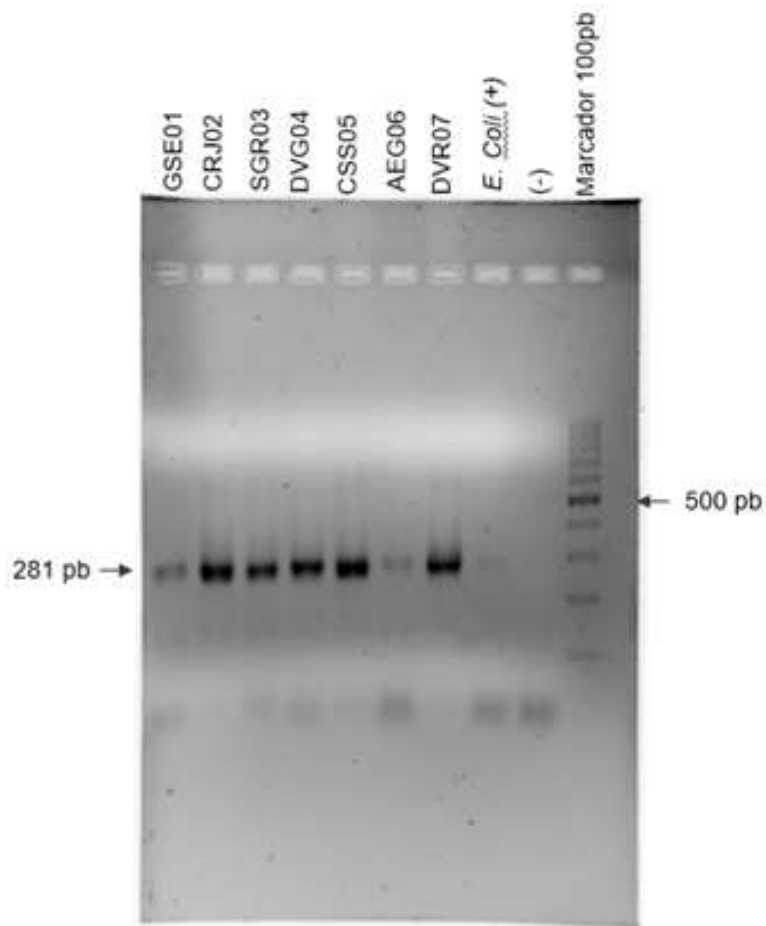


Figura 20. Preparación de genoteca de la región V3 del gen 16S rDNA. Se observa un gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los amplicones de PCR con iniciadores V3 341F y V3 518R con tamaño de 281 pb de 7 muestras de mujeres casos, de *E. coli* como control positivo y el control negativo sin DNA molde.

Se llevaron a cabo réplicas de las reacciones de PCR de cada muestra con barcode y los productos se mezclaron para obtener un mayor volumen de muestra. Se hicieron mezclas de 50 muestras, dos en total, agregando el volumen necesario de cada muestra para tener una concentración aproximada de 10 μ g de cada producto de PCR.

Se llevó a cabo la electroforesis de cada una de las mezclas en gel preparativo de agarosa al 2.0% como se muestra en la Figura 21, se cortó la banda con el tamaño cercano a 300pb y se purificó el producto de PCR por medio del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega.

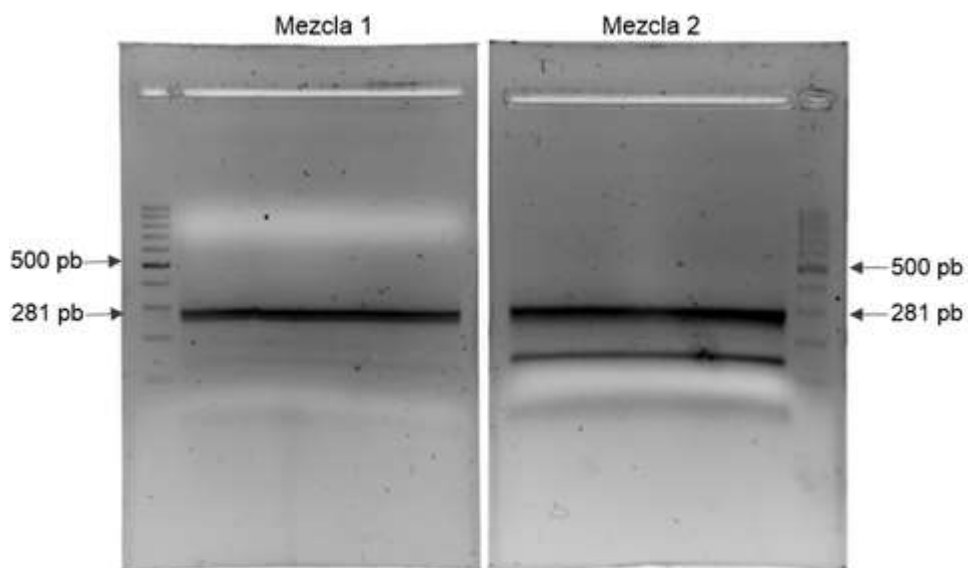


Figura 21. Geles preparativos de mezclas 1 y 2 de genotecas del gen 16S rDNA. La banda de 281 pb fue cortada para la purificación de la genoteca.

4.3. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN V5 DEL GEN 18S rDNA

Se amplificaron las 92 muestras usando el par de iniciadores 18S F y 18S 200R para verificar la presencia de DNA micótico con amplicones de 300 pb, los cuales se observaron solamente en 36 muestras en geles de agarosa al 1.5% tal y como se ejemplifica en la Figura 22.

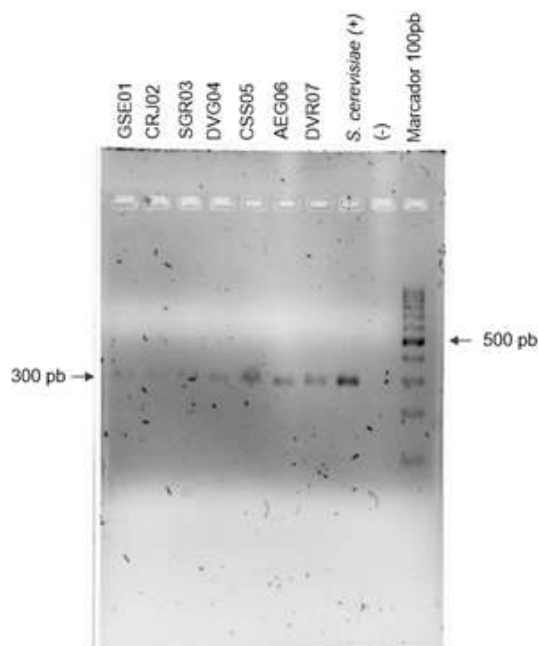


Figura 22. Amplificación de la región V5 del gen rDNA 18S. Se observa un gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los amplicones de PCR con iniciadores 18S F y 18S 200R con tamaño de 300 pb de 7 muestras de mujeres casos, de *S. cerevisiae* como control positivo y el control negativo sin DNA molde.

4.5. PREPARACIÓN DE GENOTECAS DE LA REGIÓN V5 DEL GEN rDNA 18S.

Una vez confirmada la presencia de DNA micótico en cada muestra se realizaron las reacciones de PCR de las 92 muestras de mujeres casos y controles usando el par de iniciadores V3 341F y V3 518R con las secuencias barcode, cuyos amplicones de 381 pb se observaron en geles de agarosa al 1.5% únicamente en 27 muestras, como se ejemplifica en la Figura 23, lo que impidió la construcción de la genoteca completa y por lo tanto la secuenciación masiva de la región V5 del gen 18S rDNA.

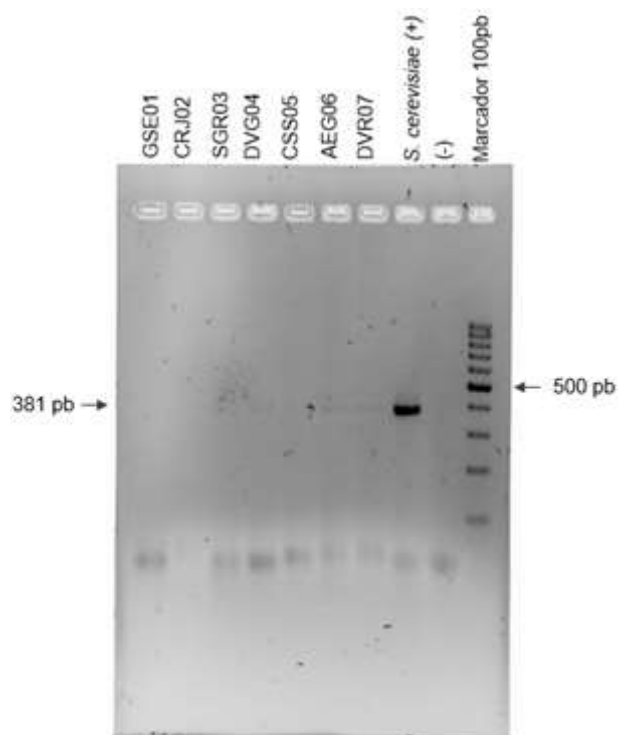


Figura 23. Preparación de genoteca de la región V5 del gen 18S rDNA. Se observa un gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los amplicones de PCR con iniciadores 18S F y 18S 200R con secuencia barcode con tamaño de 381 pb de 7 muestras de mujeres casos, de *S. cerevisiae* como control positivo y el control negativo sin DNA molde.

5. Diagnóstico de especies de *Cándida* por amplificación con PCR

Se realizaron 3 reacciones por cada mujer, una para el par de iniciadores de *C. albicans*, *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, observado la presencia o ausencia de dichos microorganismos por medio de los amplicones específicos en geles de agarosa al 1.5% como se ejemplifica en la Figura 24.

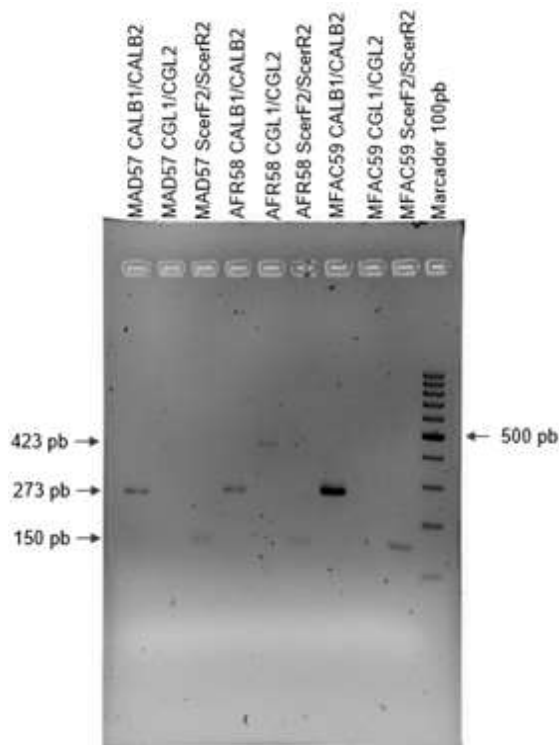


Figura 24. Diagnóstico de especies de *Cándida* por PCR. Se observa un gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los amplicones de PCR donde se observan amplicones de PCR para tres mujeres control. En el carril 1 se encuentra un amplicón de 273 pb que indica presencia de *C. albicans* y en el carril 3 un amplicón de 150 pb que indica *S. cerevisiae*. En la mujer 2 se encontraron amplicones para *C. albicans* en el carril 4, para *C. glabrata* de 423 pb en el carril 5 y para *S. cerevisiae* en el carril 6. Finalmente, para la mujer 3 solo se encontró amplicón de *C. albicans* en el carril 7.

Se corroboró la presencia de *Candida* spp. en todas las mujeres casos. Una mujer (2.2%) con sólo *C. albicans*, 37 mujeres (80.4%) con *C. glabrata* y 8 mujeres (17.4%) con coinfección por *C. albicans* y *C. glabrata*. En las mujeres controles se encontraron 29 (63.04%) con *C. albicans*, 2 (4.34%) con *C. glabrata*, 9 (19.56%) con *C. albicans* y *C. glabrata* y 6 (13.04%) con ausencia de *Candida*.

El test de ANOVA demostró diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en la ausencia de *Candida* ($p = 0.037$), presencia de *C. albicans* ($p = 0.001$), presencia de *C. glabrata* ($p = 0.001$) y sin diferencia en la presencia de ambas especies ($p = 0.717$), como se resume en la Tabla 17.

Tabla 17. Mujeres casos y controles con presencia/ausencia de *C. albicans* y *C. glabrata*

	CASOS (46)		CONTROLES (46)		p ANOVA
	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje	
No detectada	0	0.0	6	13.04	0.037
<i>C. albicans</i>	1	2.2	29	63.04	0.001
<i>C. glabrata</i>	37	80.4	2	4.34	0.001
<i>C. albicans/C. glabrata</i>	8	17.4	9	19.56	0.717
Total	46	100.0	46	100.00	

El alineamiento tipo BLAST de la secuencia consenso de los amplicones de los iniciadores CALB1/CALB2 reportó 100 secuencias de diferentes cepas de *Candida albicans* incluyendo el ITS1 completo, el gen 5.8S rRNA completo, el ITS2 completo y una parte del gen 23S rRNA con identidad del 100%, porcentaje de cobertura de la secuencia de 87% y un E value de 3e-139.

El alineamiento tipo BLAST de los amplicones de los iniciadores CGL1/CGL2 reportó 100 secuencias de diferentes cepas de *Candida glabrata* incluyendo una parte del ITS1, el gen 5.8S rRNA completo y una parte del ITS2 con identidad del 99%, porcentaje de cobertura de la secuencia de 88% y un E value de 0.0.

Finalmente, el alineamiento tipo BLAST de los amplicones de los iniciadores ScerF2/ScerR2 reportó 100 secuencias de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de una parte del cromosoma XVI, en el cual se encuentra el gen MEX67, con identidad del 99%, porcentaje de cobertura de la secuencia de 100% y un E value de 1e-69.

6. Caracterización de la Diversidad de la Microbiota Vaginal

6.1. ABUNDANCIAS RELATIVAS DE BACTERIAS EN MUESTRAS VAGINALES

Al comparar los OTUs generados de la secuenciación masiva contra la base de datos Green Genes, se obtuvieron gráficos de la abundancia relativa de bacterias encontradas a nivel de familia y género para cada mujer, los cuales se muestran en la Figura 25.

Al observar estas gráficas se encontró que 9 mujeres controles (19.56%) tienen un bajo porcentaje de *Lactobacillus* spp., menor del 20% del total, y con una alta abundancia relativa de bacterias asociadas a VB tales como *Gardnerella* sp., *Snethia* sp., *Megasphaera* sp., *Prevotella* sp. y *Clostridium* sp. Por esta razón, se decidió separar a dichas mujeres en un tercer grupo de estudio, denominado VB, debido a que no son realmente mujeres sanas a pesar de haberse referido asintomáticas. Posteriormente se realizaron gráficas de abundancia relativa de las mujeres divididas en 3 grupos: casos, controles y VB, que se observan en la Figura 26. Se encontró una abundancia relativa de *Lactobacillus* spp. distinta en los tres grupos. El grupo Casos tiene una abundancia relativa de 59.19%, el grupo Controles de 70.83% y el grupo VB de tan sólo 6.33%. El grupo Casos tiene además un aumento en la abundancia relativa de *Gardnerella* sp. de 9.50%, comparado con un 2.57% en el grupo Controles. Este género bacteriano se encuentra en un 8.01% en el grupo VB, es decir, incluso menor que en el grupo Caso. Además, encontramos una abundancia relativa de *Prevotella* sp. de 9.50% en el grupo Casos, de 2.57% en el grupo Controles y de 11.87% en el grupo VB. Otra bacteria aumentada en el grupo Casos es *Snethia* spp. con 6.78%, quien se encuentra con tan sólo un 0.63% en el grupo Controles y en un 10.44% en el grupo VB. De igual manera, se realizaron gráficas para observar las abundancias relativas de acuerdo a diferentes características clínicas de las mujeres.

En la Figura 27 encontramos diferencias en la abundancia relativa de *Lactobacillus* spp. de acuerdo al método anticonceptivo de la mujer. Las mujeres que usan implante hormonal, DIU y ACO son las que tienen mayor abundancia relativa de este género, de 69.62%, 77.95% y 75.76% respectivamente, mientras que las mujeres que usan anillo vaginal son las que menor porcentaje tienen, con tan sólo un 5.60%. De igual manera, las mujeres de este último grupo son las que tienen una mayor abundancia relativa de *Gardnerella* spp. con un 60.83%, seguidas de las mujeres que no usan método anticonceptivo con 11.91% y las mujeres con OTB con 3.77%.

Con respecto al día del ciclo sexual en que se encontraban al día de la toma de muestra, vemos en la Figura 28 que las mujeres en la fase Folicular tienen la mayor cantidad de *Lactobacillus* spp., con el 63.69%, seguidas de la fase de Ovulación con 54.69% y finalmente las de la fase Lútea, con 53.16%.

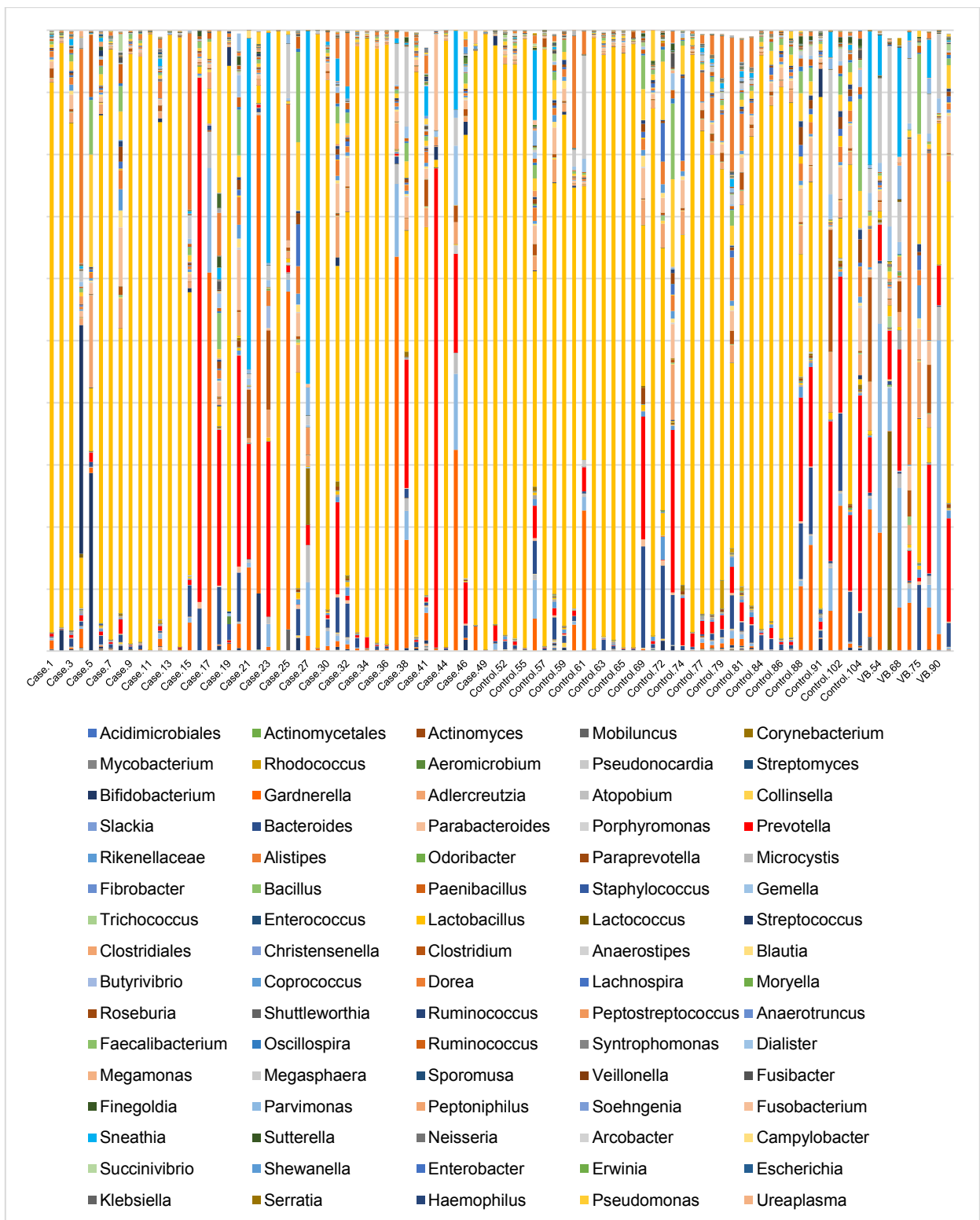


Figura 25. Abundancia relativa a nivel de familia/género de muestras casos y controles. Se muestra una gráfica de barras en la que cada color representa las familias/géneros más abundantes en una muestra vaginal de mujeres casos y controles. Abajo se enuncian las familias/géneros más encontrados con un recuadro que identifica el color con el que se representa en la gráfica.

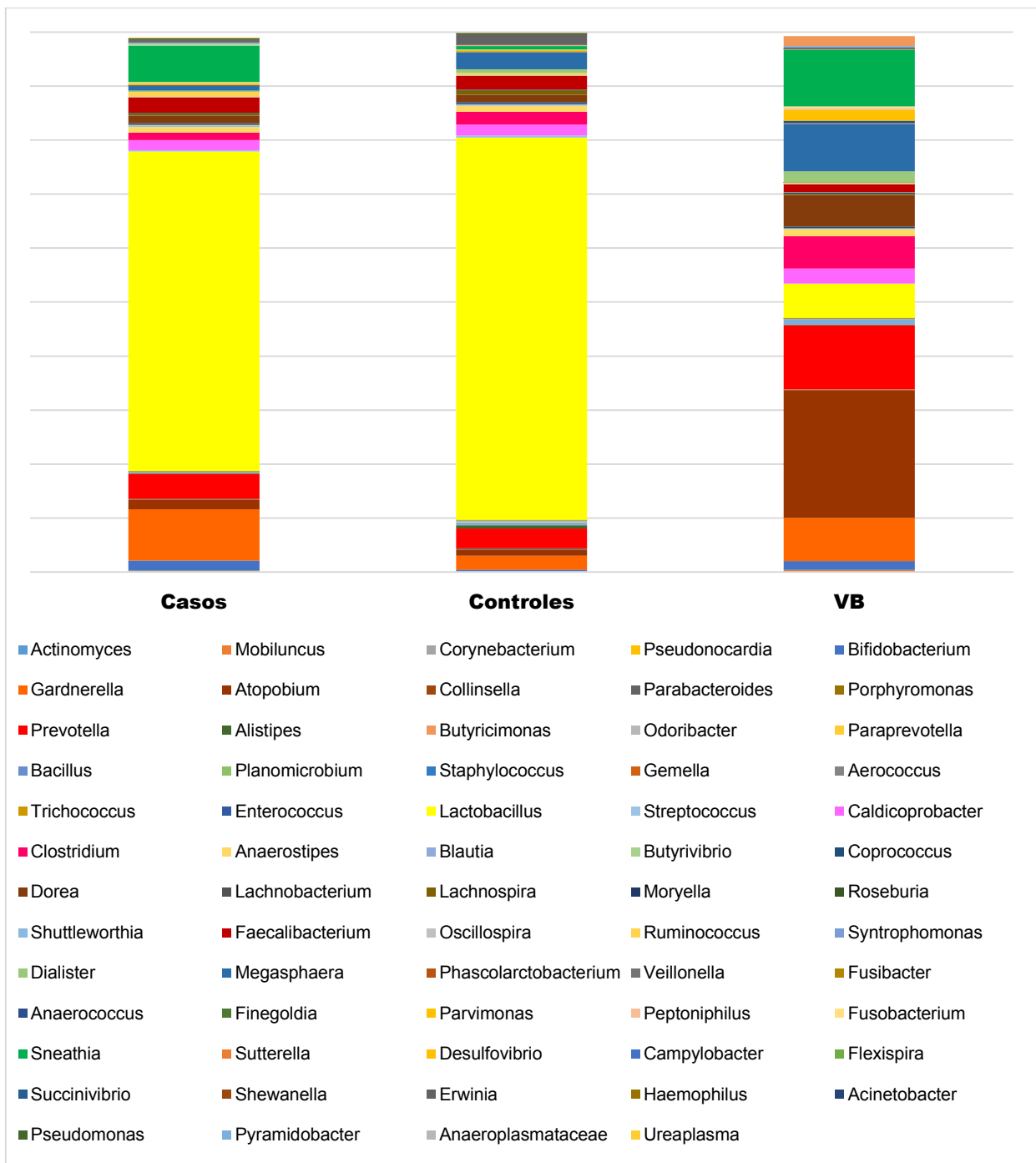


Figura 26. Abundancia relativa a nivel de familia/género de los grupos casos, controles y VB. Se muestra una gráfica de barras en la que cada color representa las familias/géneros más abundantes en una muestra vaginal de mujeres casos y controles. Abajo se enuncian las familias/géneros más encontrados con un recuadro que identifica el color con el que se representa en la gráfica.

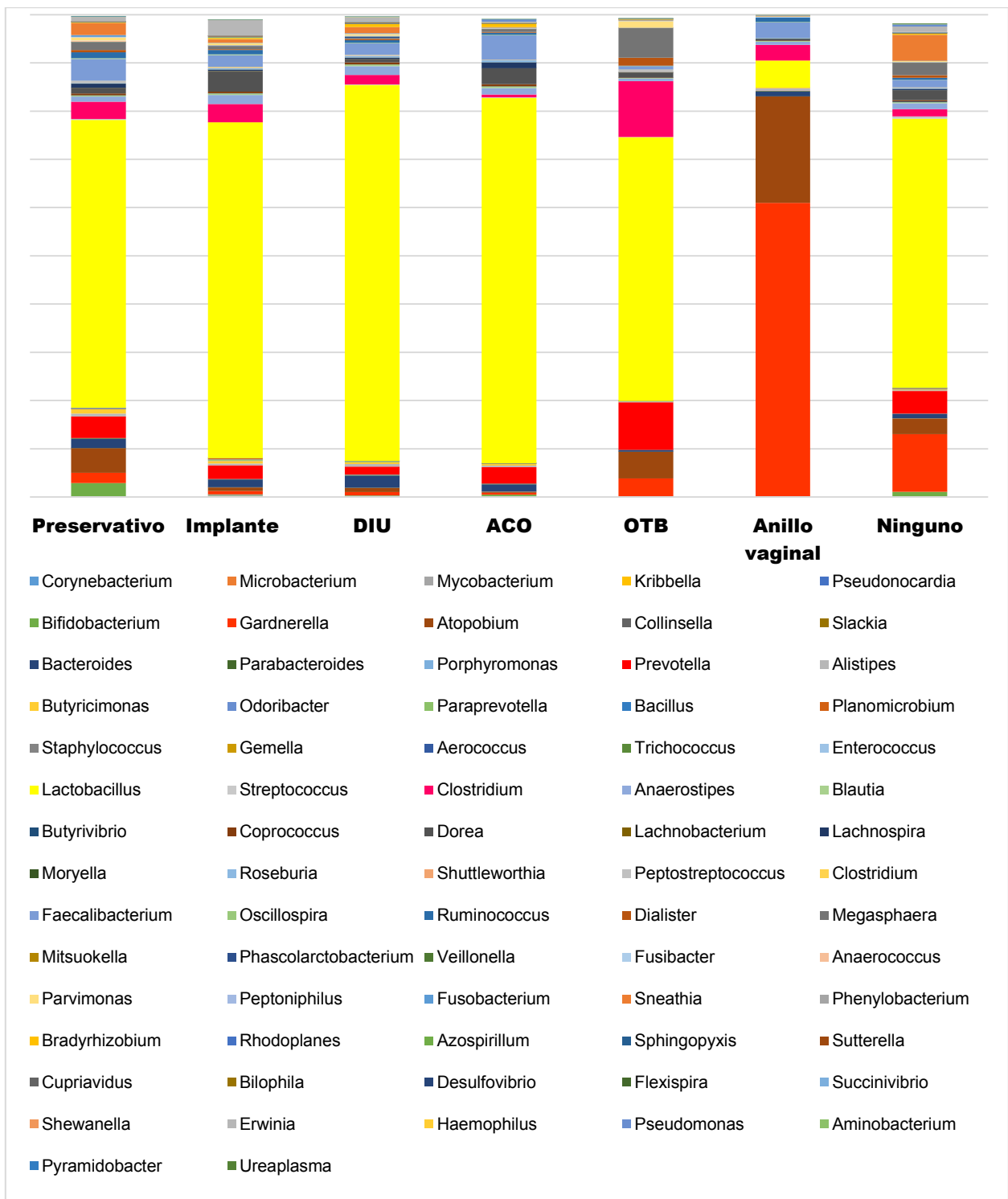


Figura 27. Abundancia relativa a nivel de género de grupos de métodos anticonceptivos. Se muestra una gráfica de barras en la que cada color representa los géneros más abundantes en una muestra vaginal de mujeres casos y controles. Abajo se enuncian las familias/géneros más encontrados con un recuadro que identifica el color con el que se representa en la gráfica.

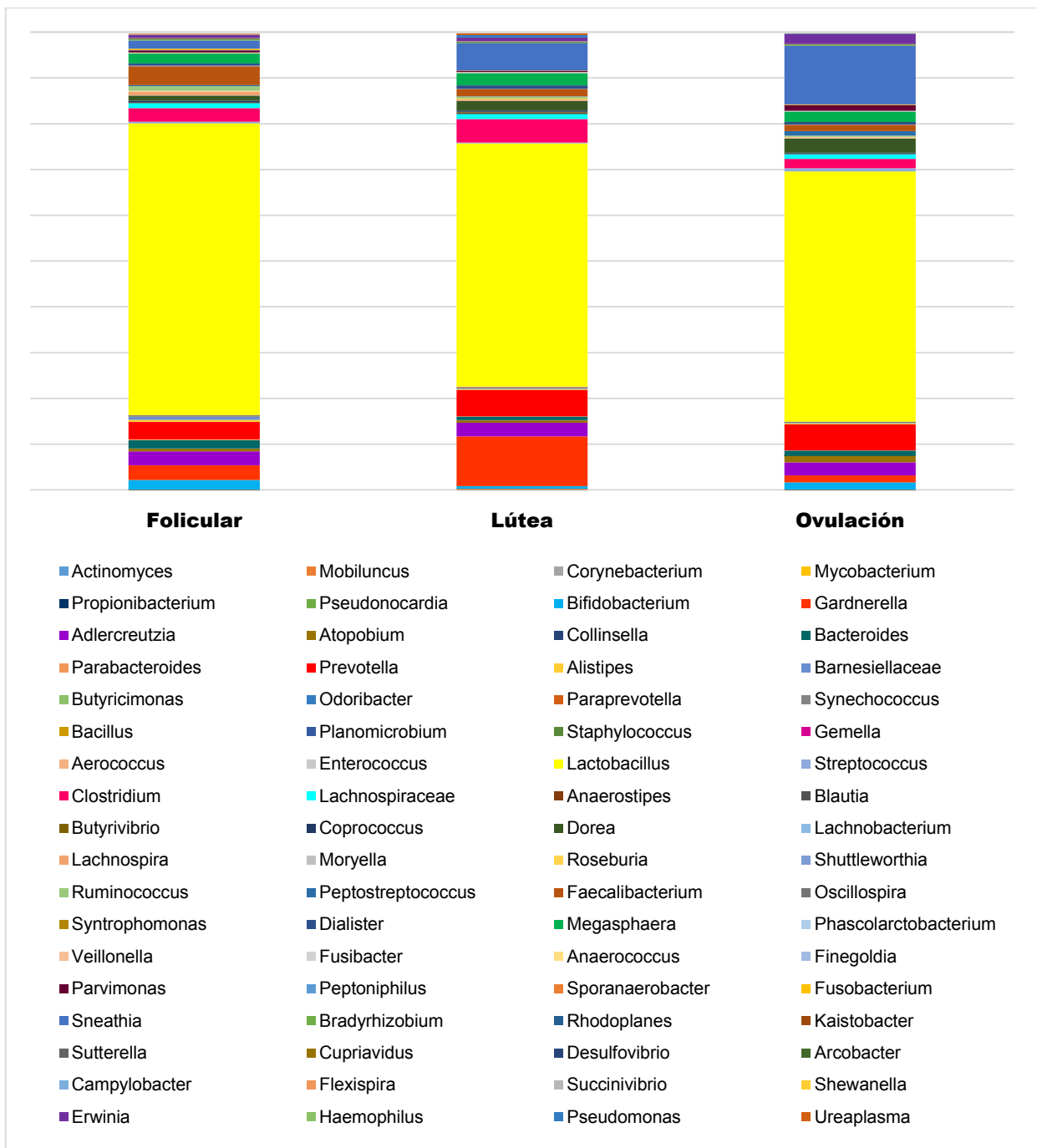


Figura 28. Abundancia relativa a nivel de género de grupos de fase del ciclo sexual. Se muestra una gráfica de barras en la que cada color representa los géneros más abundantes en una muestra vaginal de mujeres casos y controles. Abajo se enuncian las familias/géneros más encontrados con un recuadro que identifica el color con el que se representa en la gráfica.

6.2 ÍNDICES DE DIVERSIDAD

Las lecturas contenidas en archivos FASTA se analizaron en QIIME v1.9.0. Las secuencias se agruparon en 249 OTUs de familias y géneros bacterianos con los cuales se realizó un análisis de la diversidad alfa que se observa en la Figura 29.

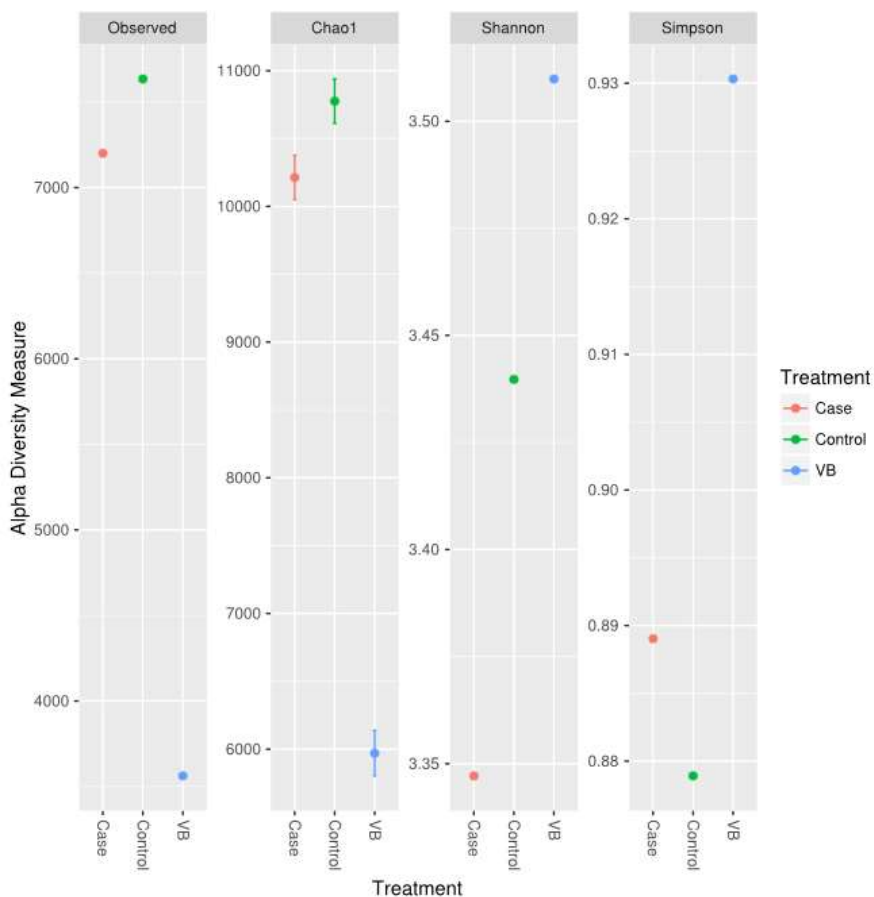


Figura 29. Índices de alfa Diversidad en los tres grupos de estudio. Se observa el promedio de número de OTUs en la medida de la alfa diversidad de cada grupo, con valores por arriba de 7000 en Casos (rosa) y Controles (verdes) y por debajo de 4000 en VB (azul). El índice de Chao1 muestra la misma distribución. Los índices de Shannon y Simpson muestran una mayor diversidad en el grupo VB y una mayor dominancia en el grupo de Controles.

En la Figura 29 se muestran los valores de alfa diversidad indicados por los índices Chao1, Shannon y Simpson.

El índice Chao1 da un estimado del número de OTUs esperados en un nicho, mientras que la medida de la alfa diversidad nos indica el verdadero número de OTUs que encontramos en nuestros 3 grupos.

Al compararlos encontramos que a pesar de que el orden de los grupos es igual en ambos parámetros (Controles-Casos-VB), el número de OTUs en la medida de alfa diversidad es menor que los indicados por el índice de Chao1. Esto puede deberse a una falta de profundidad de la secuenciación masiva que se llevó cabo, siendo necesario mejorar la calidad de la genoteca y alargar la secuencia a estudiar.

Con base al índice de Shannon, los tres grupos se consideran diversos pues tienen un valor mayor de 3. El grupo más diverso es el VB (>3.5), seguido del grupo Controles (>3.40) y por último del grupo Casos (<3.35).

El índice de Simpson tiene valores entre 0 y 1 y cuanto menor sea su valor la diversidad será mayor. Representa la probabilidad de que dos individuos, dentro de un hábitat, seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie. En este índice el valor más cercano a 1 es el del grupo de VB, seguido del grupo Casos y por último del grupo Controles. Podemos decir entonces que hay mayor dominancia de algunos géneros específicos en el grupo de VB, incluyendo los géneros *Atopobium* (23.66%), *Prevotella* (11.48%), *Sneathia* (10.44%), *Megasphaera* (8.77%) y *Gardnerella* (8.01%).

6.3 PRUEBA ESTADÍSTICAS

Para buscar diferencias estadísticamente significativas de la presencia de bacterias en las muestras de hisopado vaginal se realizaron pruebas estadísticas a las abundancias absolutas de la tabla de OTUs identificados a diferentes niveles taxonómicos (filum, clase, orden, familia y género) incluyendo la prueba de Kruskal-Wallis que fue corregida por Tasa de Descubrimiento de Falsos (*False Discovery Rate* FDR) y por la prueba de Bonferroni para corregir falsos positivos (error de tipo 1).

Al analizar a los 3 grupos de estudio (casos, controles y VB) con estas pruebas estadísticas, se encontraron 8 géneros y 2 familias de bacterias con diferencias estadísticamente significativas, es decir, con valores de $p < 0.05$ en las tres pruebas. Dichas bacterias se muestran en la Figura 30, donde se observan además las abundancias relativas en cada grupo. Posteriormente se realizó el mismo análisis pero excluyendo al grupo de VB, con el cual se encontraron los mismos géneros y familia con diferencia significativa, pero además se encontró diferencia significativa en el género *Lactobacillus* con una p de 0.05, como se muestra en la Figura 31.

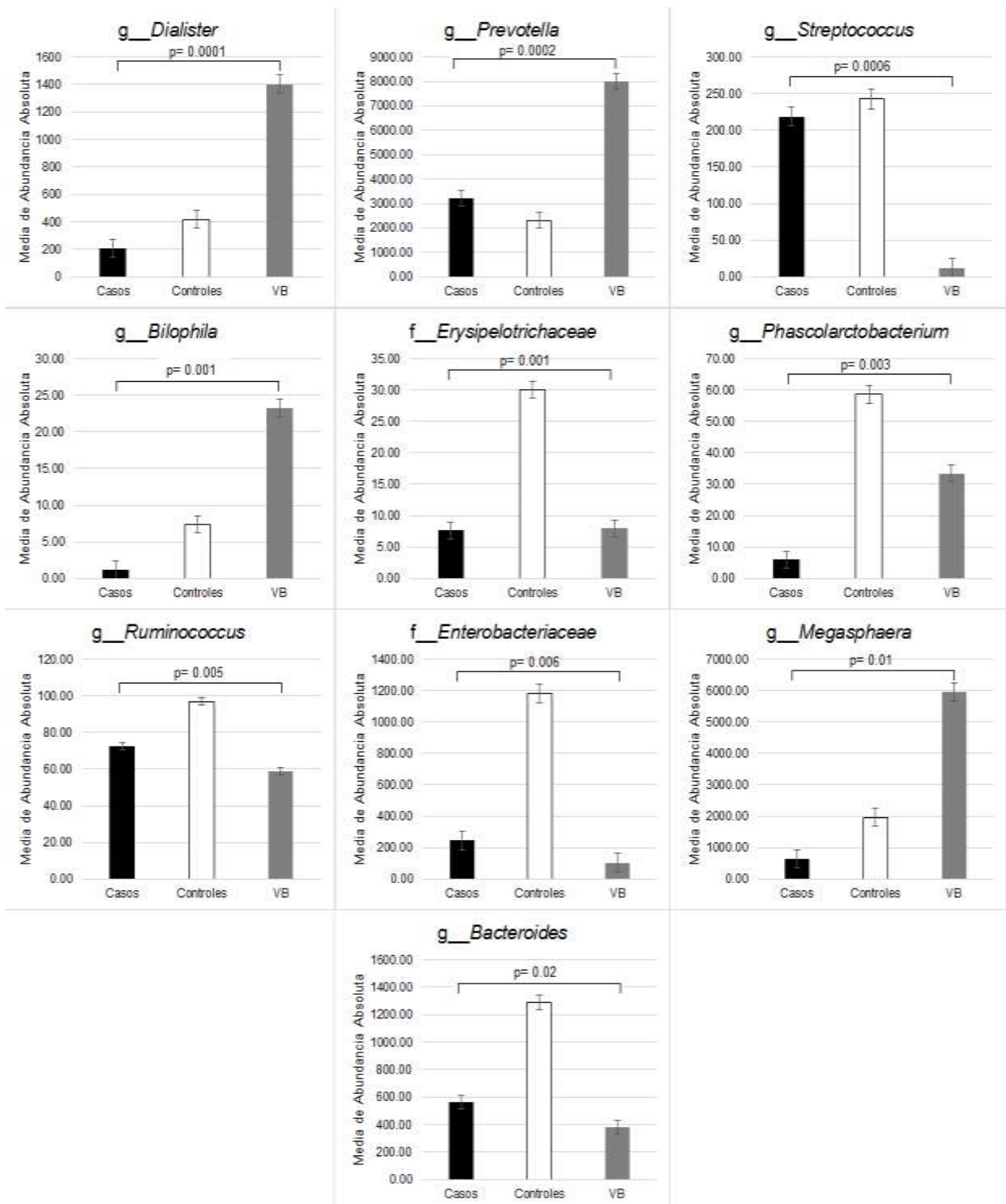


Figura 30. Gráficas de 8 géneros y 2 familias de bacterias con diferencia estadísticamente significativa entre casos, controles y VB. Se observan 9 gráficas de barras que muestran las abundancias absolutas de 8 géneros y 1 familia de bacterias que tuvieron $p < 0.05$ en la prueba de Kruskal-Wallis corregida con FDR y Bonferroni. Los casos se ilustran en barras de color negro, los controles en barras de color blanco y las mujeres con VB en barras de color gris. La p de cada bacteria se enuncia en cada gráfica.

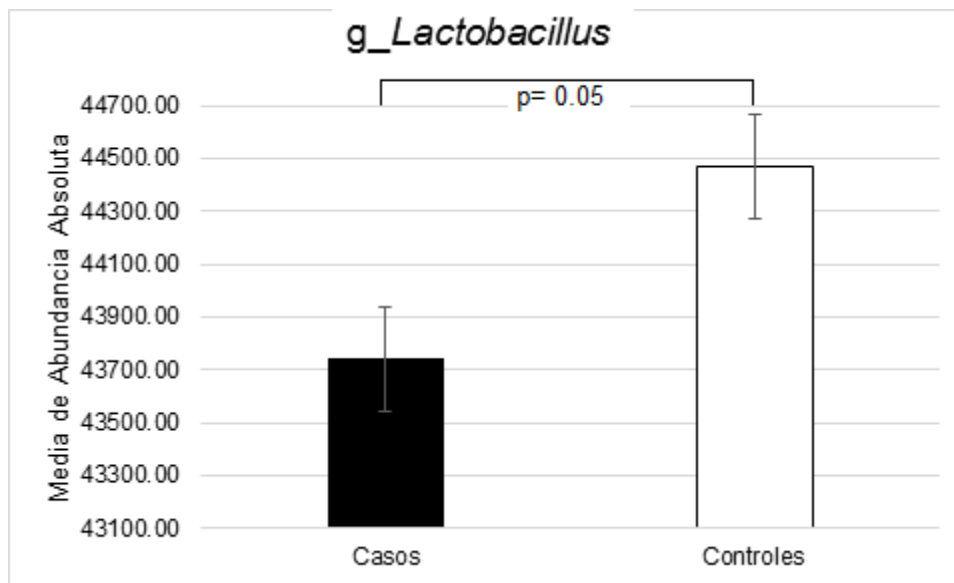


Figura 31. Gráfica de 1 género con diferencia estadísticamente significativa entre casos y controles. Se observa gráfica de barras que muestra las abundancias absolutas de *Lactobacillus* con $p < 0.05$ en la prueba de Kruskal-Wallis corregida con FDR y Bonferroni. Los casos se ilustran en barras de color negro y los controles en barras de color blanco.

Al realizar las mismas pruebas estadísticas separando a las mujeres de acuerdo al método anticonceptivo que utilizan encontramos $p < 0.05$ en los fila Proteobacterias, los órdenes Clostridiales, Bacteroidales y Bifidobacteriales, la familia *Lachnospiraceae* y en ningún género. Estas mismas pruebas estadísticas no arrojaron ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las bacterias de las mujeres de acuerdo a la fase del ciclo sexual en que se encontraban al momento de la toma de la muestra.

VIII. DISCUSIÓN

La CVVR es un problema de salud importante que causa un deterioro grave en la salud reproductiva de las mujeres que la padecen. Conocer los factores que determinan que esta infección se vuelva recurrente es de gran importancia, así como los agentes etiológicos de las recurrencias que pueden resistir tratamientos comunes.

Existen reportes que relacionan los altos niveles de estrógenos con la sintomatología de CVV (Sobel J. 2015), llegando a empeorar en usuarias de métodos anticonceptivos hormonales.

Sin embargo, sólo el 13.0% de las mujeres casos utilizan algún método anticonceptivo hormonal, mientras que son usados por el 29.8% de las mujeres asintomáticas, es decir, no encontramos correlación entre los niveles de estrógenos y la recurrencia de CVV.

Se sabe además que un pH vaginal normal en una mujer con síntomas de vaginitis es parte importante del cuadro clínico de la CVV pues descarta la posibilidad de VB (Sobel J. 2015), pero tampoco encontramos una diferencia significativa entre nuestros dos grupos, quienes presentaron una media de pH de 4.46 y de 4.37 en las mujeres casos y controles respectivamente, es decir, pH normal, resultados similares a los reportados en estudios previos de CVV (Mi-Biao *et al.*, 2013).

En las tinciones de Gram que se realizaron a las muestras vaginales de dos mujeres controles pudimos comprobar que las mujeres con tratamiento antibiótico sistémico en el mes previo a la toma de la muestra tienen una baja importante de bacilos Gram positivos, presumiblemente *Lactobacillus*, razón por la cual dichas muestras tuvieron un bajo rendimiento en la extracción de DNA y fueron imposibles de amplificar incluso con los iniciadores CGO465. Podemos concluir entonces que el criterio más adecuado para incluir a mujeres en un estudio de microbiota vaginal es no haber tenido tratamiento antibiótico sistémico en al menos 3 meses.

Este trabajo identificó por medio de PCR con iniciadores específicos a *C. albicans* y *C. glabrata* como agentes causales de CVVR en 46 mujeres. Aunque se sabe que *C. albicans* es responsable del 98.0% de la CVV esporádica, se ha reportado que las especies no-*albicans* pueden causar hasta el 32.0% de las recurrencias (Reynaud A., 2007). En 2006, por medio de pruebas bioquímicas tipo API 20C, se determinó como especies más frecuentes en mujeres mexicanas con vaginitis a *C. albicans* (39.0%), *C. glabrata* (35.9%) y *C. tropicalis* (16.2%), (Rivera-Sánchez *et al.*, 2006). Esta última especie no fue evaluada en este trabajo, sin embargo encontramos una importante diferencia en los porcentajes de *C. albicans* (2.12%) y *C. glabrata* (80.4%), además de coinfecciones (17.4%), lo cual puede deberse a que todas nuestras mujeres eran casos de recurrencia.

Es posible que la alta prevalencia de *C. glabrata* se deba a que se trata de mujeres multitratadas con antimicóticos y antibióticos prescritos por diferentes médicos e incluso existe la posibilidad de que las mujeres se hayan automedicado en algún momento.

Todo esto lleva a una probable disbiosis vaginal tanto en su componente bacteriano como micótico, provocando que los microorganismos más resistentes, incluyendo a *C. glabrata*, adquieran la capacidad de provocar infecciones de repetición (Sobel, 2015).

Por otro lado, en 2014 se reportó por medio de cultivos únicamente el 12.5% de mujeres asintomáticas mexicanas colonizadas por *Candida* spp. (Solis-Arias *et al.*, 2007). En nuestra muestra el 90.9% de las mujeres sin síntomas de vaginitis resultaron positivas para al menos una especie de *Candida* spp., siendo *C. albicans* la más común (65.9%). La diferencia entre los resultados de estos dos estudios realizados en mujeres mexicanas puede deberse principalmente a la técnica utilizada para la identificación de *Candida* spp. Solis-Arias *et al.* realizaron cultivos directos de hisopados vaginales en medios CHROMagar *Candida* (BD BBL®), cultivos cromogénicos específicos para identificar las especies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei* por medio de los colores de sus colonias. Sin embargo, es bien sabido que existen microorganismos no cultivables que forman parte de la microbiota vaginal, incluyendo diferentes géneros de hongos. Existe además la posibilidad de que *Candida* se encuentre formando micelios y no esté en su forma de levadura, por lo que disminuye su capacidad de crecer en medios de cultivo. Por esta razón consideramos que los resultados arrojados por métodos moleculares, tales como una PCR con iniciadores específicos, brinda mayor certeza de la presencia o ausencia de estas especies micóticas en las mujeres muestreadas.

Llama la atención el que las mujeres de ambos grupos tienen presencia similar de *Candida* spp., con tan sólo un 9.1% de diferencia. Este resultado es similar a los descritos en 2000 por Giraldo *et al.* quienes encontraron por técnica de PCR una diferencia de tan sólo 1.2% de presencia de *Candida* spp. entre mujeres sanas y mujeres con historia de CVVR. En dicho estudio además encontraron diferencias importantes en los resultados arrojados por distintas pruebas paraclínicas, incluyendo PCR, cultivos y tinción de Gram, siendo las últimas dos las que identificaron en menor porcentaje a mujeres sanas con *Candida* spp. (6.6% y 4.4% respectivamente) (Giraldo *et al.*, 2000).

Los resultados de Giraldo *et al.* y los nuestros nos indican que a pesar de que todos los procedimientos de laboratorio son de gran valor para llegar a un diagnóstico definitivo que identifique al agente etiológico, los métodos moleculares complementan de una manera importante el diagnóstico, brindando mayor sensibilidad y especificidad pues pueden incluso determinar la presencia de patógenos en mujeres sanas que únicamente se encuentran formando parte de la microbiota normal de esa localización anatómica.

Al analizar los resultados de la caracterización de la diversidad de bacterias en la microbiota vaginal, encontramos 9 mujeres controles con vaginosis bacteriana quienes no sólo se reportaron asintomáticas, si no que no se observaron signos clínicos al momento de la toma de muestra que indicaran dicho padecimiento, tales como eritema vulvar o leucorrea. Resulta muy importante tomar estos datos en cuenta, pues el 28.94% de nuestra muestra control padece VB asintomática, con todos los riesgos que este padecimiento conlleva. Es por lo tanto de suma importancia que los médicos realicen un interrogatorio exhaustivo en busca de síntomas leves de VB en todas las mujeres incluso cuando al examen físico parezcan estar sanas, así como realizar estudios paraclínicos durante la consulta de fácil ejecución. La medición de pH vaginal es probablemente la prueba más sencilla, pero nuestros resultados muestran que un pH vaginal normal no puede excluir por completo el diagnóstico, ya que el promedio encontrado en las mujeres con VB asintomática fue de 4.5, y sólo 4 de las 9 pacientes tuvieron pH de 5. Por tal motivo sugerimos incluir en la consulta ginecológica la prueba de Whiff, en la que se agrega una gota de hidróxido de potasio a la secreción vaginal en un portaobjetos; si la muestra despiden un olor característico a “pescado” se considera positiva y habla de una probable VB. Sumada a un pH vaginal mayor de 4.5 y la presencia de células clave en un frotis en fresco, la paciente puede ser diagnosticada con VB con certeza a pesar de reportarse asintomática (Secretaría de Salud, 2010).

De acuerdo a la clasificación en perfiles de la microbiota vaginal descrita por Shipitsyna *et al.* en 2013, encontramos que las mujeres casos tienen un perfil intermedio, con tan sólo el 57.78% de *Lactobacillus* del total de las bacterias así como un aumento de *Gardnerella* con el 10.23%.

Las mujeres controles tienen un perfil sano con 71.51% de *Lactobacillus* y sólo el 1.02% de *Gardnerella*. El tercer grupo tiene claramente un perfil de VB, con 6.54% de *Lactobacillus* y una dominancia de bacterias asociadas a VB incluyendo *Gardnerella* (8.38%), *Snethia* (10.92%), *Prevotella* (11.47%), *Megasphaera* (7.85%) y bacterias de la familia Coriobacteriaceae (20.92%).

La microbiota de las mujeres con CVVR es difícil de describir y de categorizar en un solo perfil, ya que en el grupo de casos encontramos mujeres con perfil sano, con perfil intermedio e incluso con perfil de VB. Podemos decir en general que las mujeres casos tienen una abundancia relativa de *Lactobacillus* menor a las mujeres controles pero mayor a las mujeres con VB, además de que hay una diferencia estadísticamente significativa en bacterias asociadas a VB, tal y como lo describieron Mu-Biao *et al.* en 39 mujeres con CVV esporádica en 2013.

Respecto a los índices de diversidad, el índice de Shannon comprende valores en un rango de 0 a 5; cuanto mayor sea este valor hay una mayor diversidad. Este índice no identifica los géneros presentes y sólo distingue unos de otros para realizar el recuento de individuos de cada uno de ellos y el recuento total. Dado que los valores de los tres grupos son mayores a 3, podemos decir que nuestros tres grupos de estudio tienen alta diversidad de bacterias. El grupo de VB es el que tiene una mayor diversidad, seguido del grupo de Controles y el grupo de Casos es el que menos diversidad tiene. Estos resultados difieren un poco de los descritos en 2013 por Mu-Biao *et al.*, quienes encontraron mayor diversidad en mujeres con CVV, colocándolas en un punto entre las mujeres sanas y las mujeres con VB de acuerdo al índice de Shannon. La diferencia puede deberse a que las mujeres de dicho estudio eran afectadas por CVV esporádica y probablemente no habían sido sometidas a múltiples tratamientos antibióticos que pueden haber afectado la diversidad microbiana de las mujeres de nuestro grupo Casos, haciéndolo menos diverso.

Por otro lado, el índice de Simpson indica que el grupo con mayor dominancia es el de VB, seguido del grupo Casos y por último del grupo Controles. Esto es de esperarse puesto que la VB se distingue no sólo por la pérdida importante de *Lactobacillus*, sino también por el aumento en la abundancia de bacterias Gram negativas y anaerobias, quienes pueden llegar a incrementarse cientos e incluso miles de veces en comparación con las de un perfil sano (Sobel *et al.*, 2015).

El test de Kruskal-Wallis demostró una diferencia estadísticamente significativa en la abundancia relativa de *Lactobacillus* spp. entre las mujeres casos y las mujeres controles cuando excluimos del análisis a las mujeres con VB ($p= 0.05$). El desarrollo de CVV se ha asociado con la falta de especies de *Lactobacillus* productoras de H_2O_2 , en especial con *L. crispatus* y *L. vaginalis*, quienes demostraron tener actividad fungistática contra *C. albicans*. *C. tropicalis* y *C. glabrata* pues compiten con ellas evitando su adhesión a la mucosa vaginal (Parolin *et al.*, 2015).

Estudios previos realizados en nuestro país han encontrado las especies de *Lactobacillus* más abundantes en la vagina de mujeres sanas, incluyendo *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. jensenii* y *L. crispatus* (Martínez-Peña *et al.*) además de *L. iners* y *L. delbrueckii* en mujeres sanas embarazadas (Hernández-Rodríguez *et al.*). Sin embargo, nuestro estudio no pudo determinar la especie de *Lactobacillus* encontrados en nuestras mujeres por lo que no podemos corroborar dichos resultados.

Con respecto al método anticonceptivo encontramos que las mujeres que usan implante hormonal, DIU y ACO son las mujeres con un perfil sano, mientras que las mujeres que usan anillo vaginal tienen perfiles intermedios o incluso de VB. Estos resultados son similares a los de Van De Wijgert *et al.* quienes reportaron que los ACO reducen la incidencia de VB en un 10-20%, aunque reportan una mayor incidencia de CVVR en las usuarias de este método (Van De Wijgert *et al.* 2013).

Sin embargo, los resultados de Lopes Dos Santos *et al.* en 2011 indican que las mujeres con métodos anticonceptivos hormonales sistémicos suelen ser las que tienen una menor abundancia relativa de *Lactobacillus* debido a los niveles bajos de estrógenos (Lopes Dos Santos *et al.*, 2011) pero en nuestra muestra las mujeres con anillo vaginal, método hormonal local, son las que tienen perfil de microbiota alterado. Una posibilidad es que la manipulación semanal que realizan estas mujeres para cambiar el anillo vaginal sea causante de la Disbiosis. Sin embargo, los resultados de Huang *et al.* refieren que el uso sostenido durante un año de anillo vaginal no incrementa el riesgo de VB ni tiene algún efecto adverso sobre el ecosistema vaginal (Huang *et al.*, 2015).

Lopes Dos Santos *et al.* también demostraron que durante la fase lútea del ciclo sexual la abundancia relativa de los *Lactobacillus* disminuye con respecto a la fase folicular, resultados que corroboramos en nuestra muestra pues encontramos a las mujeres en la fase folicular con 63.69%, a las de la fase de ovulación con 54.69% y finalmente las de la fase lútea, con 53.16% de *Lactobacillus*.

Múltiples estudios han demostrado que mujeres con VB mejoran su sintomatología gracias al uso de probióticos vía vaginal e incluso vía oral como coadyuvantes del tratamiento antibiótico (Hanson *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2016; Heczko *et al.*, 2015; Balzaretto *et al.*, 2015). Es probable por lo tanto que las mujeres con CVVR también se vean beneficiadas con dichos probióticos, que les ayuden a convertir su perfil de microbiota de uno intermedio a uno sano, que les confiera mayor protección contra la *Candida* spp. Ehrström *et al.* reportaron que la administración vía vaginal de diferentes cepas de *Lactobacillus* tras el tratamiento convencional de CVV reduce los casos de CVVR (Ehrström *et al.*, 2010). Específicamente probióticos con *L. rhamnosus* y *L. plantarum* han demostrado suprimir la biopelícula de *Candida* spp. y mejorar la cantidad de *Lactobacillus* en la vagina de las mujeres incluso tres meses después del tratamiento (De Seta *et al.*, 2014).

VALIDACIÓN DE HIPÓTESIS

Tanto al observar las gráficas de abundancia relativa como al realizar pruebas estadísticas a los datos de abundancias absolutas se observa una diferencia importante en la diversidad de la microbiota vaginal de mujeres con CVVR comparada con mujeres sanas, específicamente una disminución de la abundancia del género *Lactobacillus* y un aumento en la abundancia de bacterias relacionadas con la VB, por lo que la hipótesis ha sido validada.

IX. CONCLUSIONES

La candidiasis vulvovaginal representa un importante problema de salud pública que se hace aún más grave cuando se convierte en recurrente.

Clínicamente no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las mujeres con CVVR y las mujeres sanas, incluyendo características que la literatura marca como factores de riesgo para esta infección, tales como métodos anticonceptivos hormonales, etapa del ciclo sexual, número de parejas sexuales y tabaquismo.

Las mujeres con CVVR tienen un pH vaginal sano, con una media de 4.46, cifra parecida a la media de las mujeres sanas de 4.37.

El diagnóstico clínico es el más utilizado en la actualidad por médicos generales y ginecólogos para la candidiasis vulvovaginal y aunque valioso en casos esporádicos, puede ocasionar errores en el manejo farmacológico de los casos recurrentes causados por especies no *albicans*, provocando agravamiento de los síntomas y aumento en el número de cuadros. Aunque existen varios métodos diagnósticos de laboratorio que pueden aportar información valiosa al diagnóstico etiológico, es claro que los métodos moleculares son una opción viable para el diagnóstico definitivo de patologías tan comunes como la candidiasis vulvovaginal, mejorando así el tratamiento brindado a las mujeres y evitando resistencias y por lo tanto las recurrencias que tanto afectan a las mujeres en su calidad de vida y en su salud reproductiva.

Es recomendable que las mujeres no hayan tenido tratamiento antibiótico local o sistémico en al menos 3 meses para tener una eficiente extracción de DNA de sus muestras vaginales.

El principal agente etiológico de CVVR en mujeres mexicanas es *C. glabrata*, quien es responsable del 80.4% de los casos. La coinfección con esta especie y *C. albicans* es también muy común, provocando el 17.4% de los casos.

La colonización por diferentes especies de esta levadura es muy frecuente, siendo *C. albicans* la más prevalente con un 63.04% de las mujeres sanas.

Existe una diferencia de tan sólo el 9.1% de mujeres con presencia de *Candida* spp. entre los dos grupos, sin tener diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.037$).

El diagnóstico clínico de VB pasa por alto un porcentaje importante de mujeres con este padecimiento (19.56%), por lo que los ginecólogos deben realizar un interrogatorio profundo además de realizar estudios paraclínicos para determinar si una mujer está realmente sana. Aunque las mujeres con VB se refieran asintomáticas, esta disbiosis vaginal les confiere un factor de riesgo para enfermedades de transmisión sexual incluyendo VPH y VIH.

Los métodos anticonceptivos que se relacionan con perfil de microbiota sano son el implante hormonal, el DIU y los ACO. El preservativo, la OTB o no usar anticonceptivos se relacionan con un perfil intermedio. El uso de anillo vaginal se relaciona con VB.

Con respecto al día del ciclo sexual, en la fase Folicular se encuentra la mayor cantidad de *Lactobacillus* spp., seguida de la fase de Ovulación y finalmente de la fase Lútea.

El índice de diversidad de Shannon mostró que el grupo de VB es el que tiene mayor diversidad. El índice de diversidad de Simpson mostró que este mismo grupo es el que tiene mayor dominancia de ciertos géneros bacterianos, incluyendo *Atopobium* y *Prevotella*.

Las mujeres con CVVR tienen un perfil de microbiota intermedio, en el que se ve una disminución estadísticamente significativa de *Lactobacillus* con respecto a mujeres sanas. Esta disbiosis puede deberse a los múltiples tratamientos antibióticos y antimicóticos a los que se someten las mujeres y no precisamente a la candidiasis vulvovaginal como tal, sin embargo, es probable que las recurrencias de este padecimiento disminuyan al mejorar el perfil de microbiota vaginal por medio de tratamientos prebióticos o probióticos vía vaginal o vía oral.

X. PERSPECTIVAS

En la mucosa vaginal se encuentran múltiples especies de bacterias y hongos que coexisten en un delicado equilibrio que le confiere un buen estado de salud a su hospedera. Bajo ciertas circunstancias este equilibrio puede romperse y dar paso a una condición patológica crónica como la CVVR.

Resulta por lo tanto esencial conocer no sólo el componente bacteriano de la microbiota vaginal si no también el componente micótico. A pesar de que este trabajo intentó realizar una genoteca del gen 18S rDNA para secuenciación masiva, creemos que debido a una baja cantidad de DNA micótico extraído de nuestras muestras esto resultó imposible.

Llama la atención el no encontrar en la literatura actual reportes del componente micótico de la microbiota vaginal, lo cual nos sugiere que el método que realizamos para cumplir este objetivo es complicado y que se deben buscar otras opciones. Una de ellas es el sembrar muestras vaginales frescas en medios selectivos para levaduras, como Sabouraud con antibióticos, para extraer el DNA de las colonias que crezcan en ellos.

Sin embargo, es importante recordar que existen microorganismos no cultivables que forman parte de la microbiota vaginal, por lo que otra estrategia es mejorar la técnica de extracción de DNA de la muestra por medio del uso de perlas de zirconia, ciclos de congelación y descongelación o por molienda con nitrógeno líquido, métodos que nos aseguran un rompimiento efectivo de la pared celular de los hongos además del rompimiento de los micelios que *Candida* es capaz de formar al estar causando una infección, y con ello tener una mayor eficiencia en la extracción y obtener una mayor cantidad de ácidos nucleicos de estos microorganismos para crear la genoteca ya sea del gen 18S rDNA o de ITS.

Conocer la efectividad del tratamiento al que sometimos a las mujeres con CVVR y con VB resulta también de gran interés, en especial tras la administración de probióticos vía oral y vía vaginal. Realizarles una medición del pH vaginal y volver a caracterizar la diversidad de las bacterias vaginales nos ayudaría a corroborar el restablecimiento de una microbiota vaginal sana y saber si este perfil bacteriano realmente evita nuevos cuadros de CVV.

REFERENCIAS

- Achkar, J. M., & Fries, B. C. (2010). Candida infections of the genitourinary tract. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 253–273. <http://doi.org/10.1128/CMR.00076-09>
- Arrieta-Pérez. (2014). *Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de Vaginitis Infecciosa en Mujeres en Edad Reproductiva en el Primer Nivel de Atención*.
- Aujla, S. J., & Kolls, J. K. (2009). IL-22: A critical mediator in mucosal host defense. *Journal of Molecular Medicine*, 87(5), 451–454. <http://doi.org/10.1007/s00109-009-0448-1>
- Basso, R., Lopes, N., Pereira, K. B., Mezzari, A., & Fuentefria, A. M. (2012). Etiología de la candidiasis vulvovaginal recidivante en la Atención Primaria de Salud en Santa Catarina , Brasil. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(Vvc), 399–404.
- Beigi R., Meyn L., Moore D., Krohn M., Hillier S. Vaginal Yeast Colonization in Nonpregnant Women: A Longitudinal Study Vaginal Yeast Colonization in Nonpregnant Women: A Longitudinal Study. *Obstetrics & Gynecology* 2004; 104(5): 926-930.
- Brown, G. D., Taylor, P. R., Reid, D. M., Willment, J. a, Williams, D. L., Martinez-Pomares, L., ... Gordon, S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(3), 407–412. <http://doi.org/10.1084/jem.20020470>
- Carrada-Bravo, T. (2006). Tricomoniasis vaginal. *Medigraphic*, 53(3), 151–156.
- Cassone, A. (2014). Vulvovaginal Candida albicans infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 122(6), 785–794. <http://doi.org/10.1111/1471-0528.12994>
- Castrillón. (2005). Factores de virulencia en Candida sp. *Revista Mexicana de Dermatología*, 12–27.
- F. De Seta, F. Parazzini, R. De Leo, R. Banco, G.P. Maso, D. De Santo, A. Sartore, G. Stabile, *Lactobacillus plantarum* P17630 for preventing Candida vaginitis recurrence: a retrospective comparative study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 182 (2014) 136–139
- Ehrström S1, Daroczy K, Rylander E. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic implementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microbes Infect* 2010;12: 691–9.
- Fischer, G. (2012). Chronic vulvovaginal candidiasis: What we know and what we have yet to learn. *Australasian Journal of Dermatology*, 53(4), 247–254. <http://doi.org/10.1111/j.1440-0960.2011.00860.x>
- Flores-Paz Biól, R., Rivera-Sánchez, R., García-Jiménez, E., & Arriaga-Alba, M. (2003). Etiología de la infección cérvico vaginal en mujeres del Hospital Juárez de México. *Salud Pública de México*, 45(SUPPL. 5), 694–697. <http://doi.org/10.1590/S0036-36342003001100016>

- Giraldo P., Von Nowaskinski A., Gomes F.A., Linhares I., Neves N.A., Witkin S.S. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstetrics & Gynecology* 2000; 95 (3): 413-416.
- Guzmán, a. (2004). Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. *Revista Chilena de Infectología*, 21(1), 39–47. Retrieved from <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v21n1/art05.pdf>
- Hernández-Rodríguez C, Romero-González R, Albani-Campanario M, Figueroa-Damián R, Meraz-Cruz N, Hernández-Guerrero C. Vaginal microbiota of healthy pregnant Mexican women is constituted by four *Lactobacillus* species and several vaginosis-associated bacteria. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2011;2011:851485. doi: 10.1155/2011/851485.
- Huang Y, Merkatz RB, Hillier SL, Roberts K, Blithe DL, Sitruk-Ware R, et al. (2015) Effects of a One Year Reusable Contraceptive Vaginal Ring on Vaginal Microflora and the Risk of Vaginal Infection: An Open-Label Prospective Evaluation. *PLoS ONE* 10(8): e0134460. doi:10.1371/journal.pone.0134460
- Ilkit, M., & Guzel, A. B. (2011). The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(3), 250–261. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2011.576332>
- Li, J., McCormick, J., Bocking, a., & Reid, G. (2012). Importance of Vaginal Microbes in Reproductive Health. *Reproductive Sciences*, 19(3), 235–242. <http://doi.org/10.1177/19337191111418379>
- Lopes dos Santos Santiago, G., Cools, P., Verstraelen, H., Trog, M., Missine, G., El Aila, N., ... Vaneechoutte, M. (2011). Longitudinal study of the dynamics of vaginal microflora during two consecutive menstrual cycles. *PLoS ONE*, 6(11), 18–22. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0028180>
- Luo G., Mitchell T.G. Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40 (8): 2860–2865.
- Ma, B., Forney, L., & Ravel, J. (2013). The vaginal microbiome: rethinking health and diseases. *Annual Review of Microbiology*, 66, 371–389. <http://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150157>.The
- Martin, D. H. (2012). The Microbiota of the Vagina and Its Influence on Women's Health and Disease. *The American Journal of the Medical Sciences*, 343(1), 2–9. <http://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31823ea228>
- Marcos Daniel Martínez-Peña, Graciela Castro-Escarpulli, Ma Guadalupe Aguilera-Arreola. *Lactobacillus* species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:189.
- Mayer, B. T., Srinivasan, S., Fiedler, T. L., Marrazzo, J. M., Fredricks, D. N., & Schiffer, J. T. (2015). Rapid and Profound Shifts in the Vaginal Microbiota Following Antibiotic Treatment for Bacterial Vaginosis. *Journal of Infectious Diseases*, 1–10. <http://doi.org/10.1093/infdis/jiv079>

- Mending, W., & Seebacher, C. (2003). Guideline vulvovaginal candidosis: Guideline of the German Dermatological Society, the German Speaking Mycological Society and the Working Group for Infections and Infectimmunology of the German Society for Gynecology and Obstetrics. *Mycoses*, 46(9-10), 365–369.
- Merlín-Linares, Arce Hernández, L., & Rodríguez, González González, V. B. (2006). Lectina de unión a manosa: actividad biológica y significado. *Revista Cubana de Hematología E Inmunología Médica*.
- Mu-Biao Liu, Xu, S. R., He, Y., Deng, G. H., Sheng, H. F., Huang, X. M., ... Zhou, H. W. (2013). Diverse vaginal microbiomes in reproductive-age women with vulvovaginal candidiasis. *PLoS ONE*, 8(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0079812>
- Muñiz, P., Cavia, M., Bs, S. R., Bs, C. G., Herreros, M., & Coma, M. J. (2011). Niveles de indolamina-2.3-dioxigenasa en individuos sanos adultos. *Revista Electrónica de Biomedicina*, 3–7.
- Netter. (2011). *Atlas de Anatomía Humana*. (S. A. Masson, Ed.) (5a ed.). Barcelona.
- O'Hanlon, D. E., Moench, T. R., & Cone, R. a. (2013). Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS ONE*, 8(11), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0080074>
- Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Ñahui Palomino RA, Calonghi N, et al. (2015) Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-Candida Activity. *PLoS ONE* 10(6): e0131220. doi:10.1371/journal.pone.0131220
- Rampersaud, R., Randis, T., & Ratner, A. (2012). Microbiota of the upper and lower genital tract. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 29(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted
- Reynaud, A. (2007). Infecciones vaginales por cándida : diagnóstico y tratamiento. *Revista Gineco Obstreta*, 159–166.
- Rivera-Sanchez R., Flores-Paz R., Arriaga-Alba M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* 2006; 24 (10): 634-634.
- Rodriguez, N., Vélez, C. S., & Castro, N. C. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicina*, 26(1) (1), 43–55.
- Roselló-Iletí, E., Rivera, M., Bertomeu, V., Cortés, R., & Jordán, A. (2007). Interleucina-4 y fibrosis miocárdica en mujeres con insuficiencia cardíaca. *Revista Española de Cardiología*, 60(7), 777–780.
- Saraín Monjaraz–Rodríguez S., Alvarez–Gutiérrez P., Vega–Villa V., Xoconostle–Cázares B., Pérez–Luna Y. Prevalence of *Candida* spp. in women in the City of Tuxtla Gutierrez, Chiapas. *International Biotechnology Color Journal* 2012; 2 (2). 6-14.
- Secretaría de Salud. (2010). *Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Tratamiento de Candidosis Vulvovaginal*.

Shipitsyna, E., Roos, A., Datcu, R., Hallén, A., Fredlund, H., Jensen, J. S., ... Unemo, M. (2013). Composition of the Vaginal Microbiota in Women of Reproductive Age - Sensitive and Specific Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis Is Possible? *PLoS ONE*, 8(4), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0060670>

Smeeckens, S. P., van de Veerdonk, F. L., Kullberg, B. J., & Netea, M. G. (2013). Genetic susceptibility to *Candida* infections. *EMBO Molecular Medicine*, 5(6), 805–813. <http://doi.org/10.1002/emmm.201201678>

Sobel, J. (2015). *Candida* vulvovaginitis. Retrieved from www.uptodate.com

Sobel, J. D. (2007). Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, 369(9577), 1961–1971. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60917-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60917-9)

Solís-Árias M., Moreno- Morales M., Dávalos-Tanaka M., Martínez-Fernández R., DíazFlores O., Arenas-Guzmán R. Colonización vaginal por *Candida* spp. Frecuencia y descripción de las especies aisladas en mujeres asintomáticas. *Revista de Ginecología y Obstetricia de México* 2014; 82: 1-8.

Van De Wijgert JH, Verwijs MC, Turner AN, Morrison CS. Hormonal contraception decreases bacterial vaginosis but oral contraception may increase candidiasis: implications for HIV transmission. *AIDS*. 2013 Aug 24;27(13):2141-53. doi: 10.1097/QAD.0b013e32836290b6.

Zhou, X., Brown, C. J., Abdo, Z., Davis, C. C., Hansmann, M. a, Joyce, P., ... Forney, L. J. (2007). Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *The ISME Journal*, 1(2), 121–133. <http://doi.org/10.1038/ismej.2007.12>

Zhou, X., Westman, R., Hickey, R., Hansmann, M. a., Kennedy, C., Osborn, T. W., & Forney, L. J. (2009). Vaginal microbiota of women with frequent vulvovaginal candidiasis. *Infection and Immunity*, 77(9).

ANEXOS

Anexo A. Lista completa de iniciadores y “barcodes” utilizados en la preparación de genotecas del gen 16S rDNA de las muestras de lavado vaginal.

Nombr	Ion Torrent Linker	Barcode	Espaciado	Iniciador 5'-3'
V3-341 F1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	GATCTGCGAT CC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	CAGCTCATCA GC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	CAAACAACAG CT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	GCAACACCAT CC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	GCGATATATC GC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	CGAGCAATCC TA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AGTCGTGCAC AT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	GTATCTGCGC GT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	CGAGGGAAAG TC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	CAAATTCGGG AT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AGATTGACCA AC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AGTTACGAGC TA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	GCATATGCAC TG	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	CAACTCCCGT GA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	TTGCGTTAGC AG	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	TACGAGCCCT AA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	CACTACGCTA GA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	TGCAGTCCTC GA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACCATAGCTC CG	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	TGGACATCTC TT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	GAACACTTTG GA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	GAGCCATCTG TA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	TTGGGTACAC GT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AAGGCGCTCC TT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	TAATACGGAT CG	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	TCGGAATTAG AC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG

V3-341 F27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	TGTGAATTCCG GA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	CATTCGTGGC GT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AACGCACGCT AG	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACACTGTTCA TG	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F31	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACCAGACGAT GC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F32	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACGCTCATGG AT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACTCACGGTA TG	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F34	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AGACCGTCAG AC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F35	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AGCACGAGCC TA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F36	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACAGACCACT CA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F37	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACCAGCGACT AG	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F38	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACGGATCGTC AG	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F39	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AGCTTGACAG CT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F40	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AACTGTGCGT AC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F41	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACCGCAGAGT CA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F42	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACGGTGAGTG TC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F43	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACTCGATTCCG AT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F44	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AGACTGCGTA CT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F45	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AGCAGTCGCG AT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F46	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AGGACGCACT GT	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F47	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	AAGAGATGTC GA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F48	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACAGCAGTGG TC	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F49	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACGTACTCAG TG	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-341 F50	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG ACTCAG	ACTCGCACAG GA	GT	CCTACGGGAGG CAGCAG
V3-518 R FULL	CCACTACGCCTCCGCTTTCCTCTCT ATGGGCAGTCGGTGAT	No aplica	CC	ATTACCGCGGCT GCTGG

Anexo B. Lista completa de iniciadores y “barcodes” utilizados en la preparación de genotecas del gen 18S rDNA de las muestras de lavado vaginal.

Nombr	Ion Torrent Linker	Barcode	Espaciado	Iniciador 5'-3'
18S F1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	GATCTGCGAT CC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	CAGCTCATCA GC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18S F3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	CAAACAACAG CT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18S F4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	GCAACACCAT CC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	GCGATATATC GC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18S F6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	CGAGCAATCC TA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AGTCGTGCAC AT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	GTATCTGCGC GT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	CGAGGGAAAG TC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	CAAATTCGGG AT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AGATTGACCA AC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AGTTACGAGC TA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	GCATATGCAC TG	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	CAACTCCCGT GA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	TTGCGTTAGC AG	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	TACGAGCCCT AA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	CACTACGCTA GA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACACATGTCT AC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACATGATCGT TC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACGCAACTGC TA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACTGTGGAAG CT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AGCGTAGGTC GT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACACGAGCCA CA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACATGTCACG TG	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACGCGATACT GG	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACTACGTGTG GT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACTGTGACTT CA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG

18SF28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AGATCTCTGC AT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AGCTATCCAC GA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AGTCCATAGC TG	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF31	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACACGGTGTG TA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF32	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACATTCAGCG CA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACTTGTAGCA GC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF34	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AGATGTTCTG CT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF35	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	TGCAGTCCTC GA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF36	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACCATAGCTC CG	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF37	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	TGGACATCTC TT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF38	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	GAACACTTTG GA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF39	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	GAGCCATCTG TA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF40	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	TTGGGTACAC GT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF41	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AAGGCGCTCC TT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF42	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	TAATACGGAT CG	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF43	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	TCGGAATTAG AC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF44	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	TGTGAATTCG GA	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF45	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	CATTCGTGGC GT	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF46	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AACGCACGCT AG	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF47	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACACTGTTCA TG	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF48	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACCAGACGAT GC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF49	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	ACTCACGGTA TG	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18SF50	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCG AC TCAG	AGACCGTCAG AC	GT	AACGAAAGTTAG GGGATCG
18S- 200 R	CCACTACGCCTCCGCTTTCCTCTCT ATGGGCAGTCGGTGAT	NOT APPLICABLE	CC	CCACCCACAAAA TCAAGAAAGAGC TC

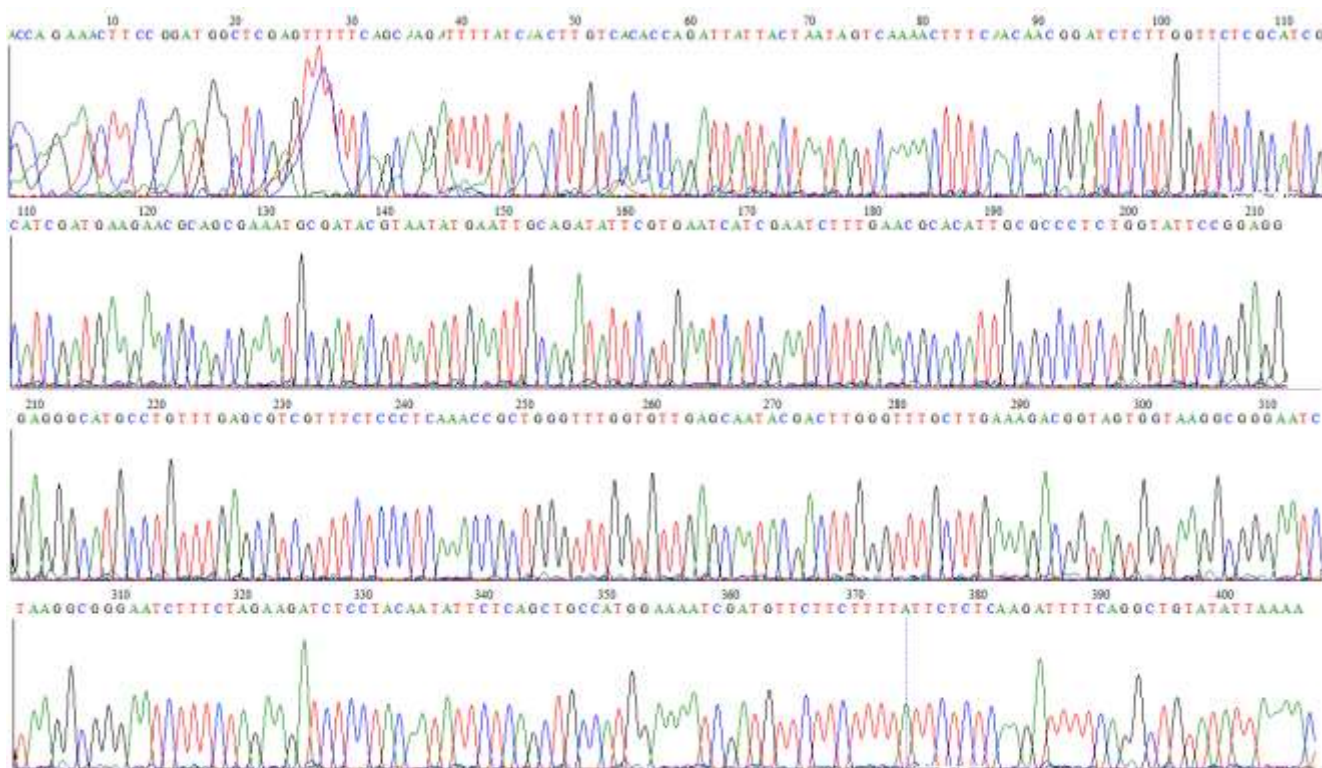
Anexo C. Presencia o ausencia de *C. albicans*, *C. glabrata* y *S. cerevisiae* en las 92 mujeres.

Mujeres Casos	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. cerevisiae</i>
GSE01		✓	✓
CRJ02		✓	✓
SGR03	✓	✓	✓
DVG04	✓	✓	
CSS05	✓	✓	✓
AEG06	✓		✓
DVR07		✓	✓
SCG08	✓	✓	✓
AFB09		✓	✓
PLR10		✓	✓
SR11	✓	✓	✓
GAS12		✓	✓
SRA13		✓	✓
LDA14	✓	✓	✓
ECG15		✓	✓
SPHG16		✓	✓
NVG17	✓	✓	
AGA18		✓	✓
AIM19		✓	✓
GNT20		✓	✓
ADPR21	✓	✓	✓
VHS22		✓	✓
MDRM23		✓	✓
VAN24		✓	✓
RMS25		✓	✓
BFS26		✓	✓
MAPG27		✓	✓
LDD29		✓	✓
SMH30		✓	✓
MIRE31		✓	✓
SRG32		✓	✓
LVP33		✓	✓
GRG34		✓	✓
PSC35		✓	✓
VMG36		✓	✓
BACM37		✓	✓
CMH38		✓	✓
NLRP40		✓	✓
JDH41		✓	✓
TFL43		✓	✓
ALHM44		✓	✓
MALA45		✓	✓
LDF46		✓	✓

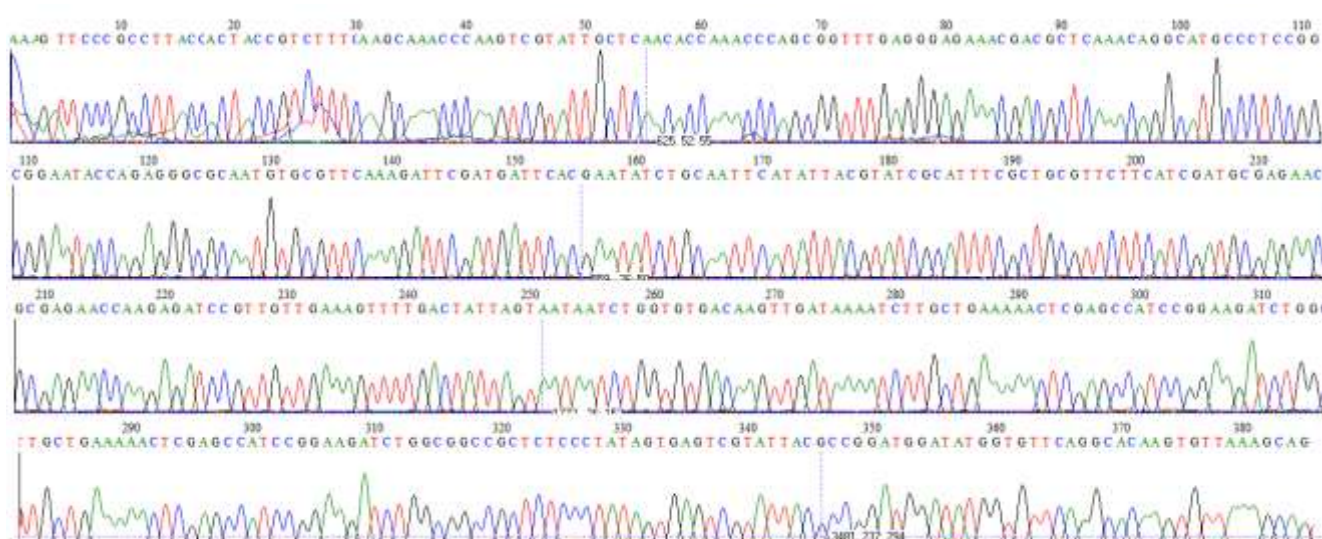
APR47		✓	✓
RMMF49		✓	✓
SAO50		✓	✓
Mujeres Controles	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. cerevisiae</i>
YVM51	✓		
BRA52			✓
ECM53	✓		
ACM54	✓		✓
FBM55	✓		✓
KTS56	✓		✓
MAD57	✓		✓
AFR58	✓	✓	✓
MFAC59	✓		✓
AMB60	✓		
VRO61	✓	✓	✓
DLA62	✓		✓
MFR63	✓	✓	✓
VAR64	✓	✓	✓
MMZ65	✓		✓
MERC66	✓	✓	✓
NPR67	✓	✓	✓
MRC68	✓	✓	✓
JFM69	✓		✓
EFP70	✓		✓
JPD71	✓		✓
LGO72	✓		✓
AMR73	✓	✓	✓
ACC74	✓		✓
AQG75	✓		✓
ICT76	✓		✓
PSMA77	✓		✓
LMS78	✓		✓
CCR79	✓		✓
RPM80	✓	✓	✓
LCLM81	✓		✓
VDRS82	✓		✓
AVS83	✓		✓
ECGA84	✓		✓
MEPS85	✓		✓
MTF86	✓		✓
RNV87			
MCSG88		✓	✓
MMOL89			✓
MGM90			✓
MAA91	✓		✓
GLDA94	✓		✓
LVR100	✓	✓	✓

Anexo D. Secuenciación por capilar de productos de PCR de diagnóstico de *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*.

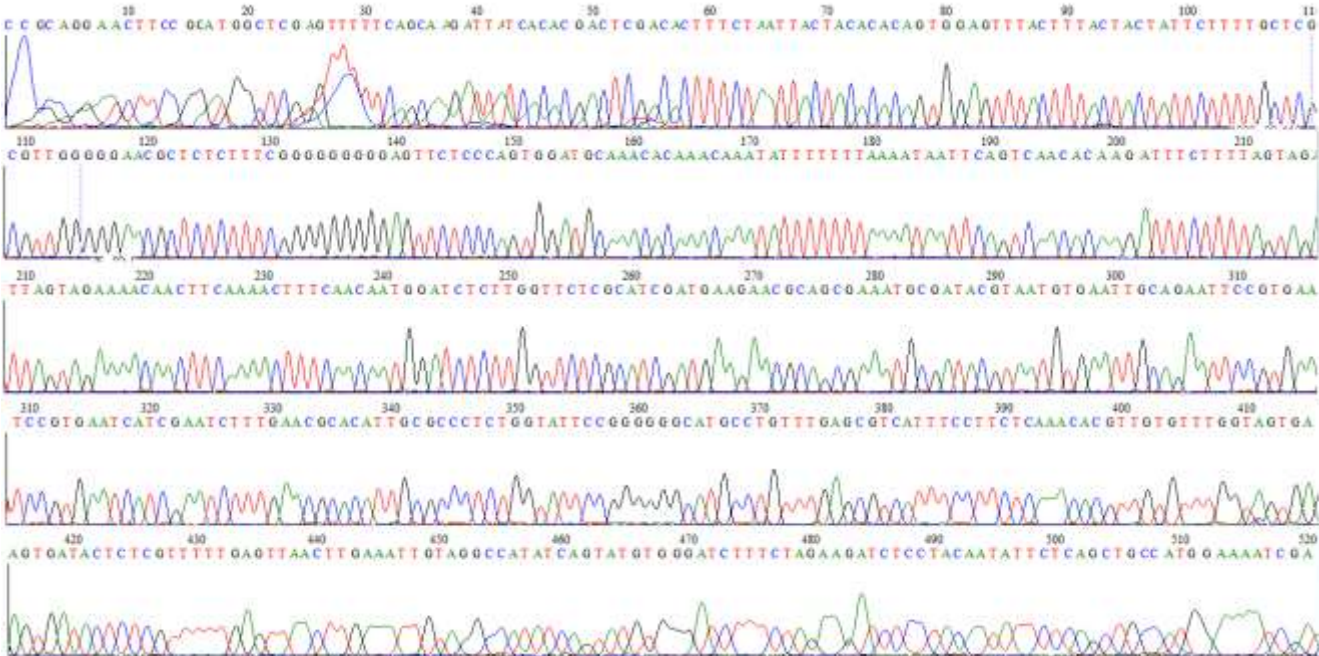
ELECTROFEROGRAMA DE PRODUCTO DE INICIADORES CGL1/CGL2 FORWARD



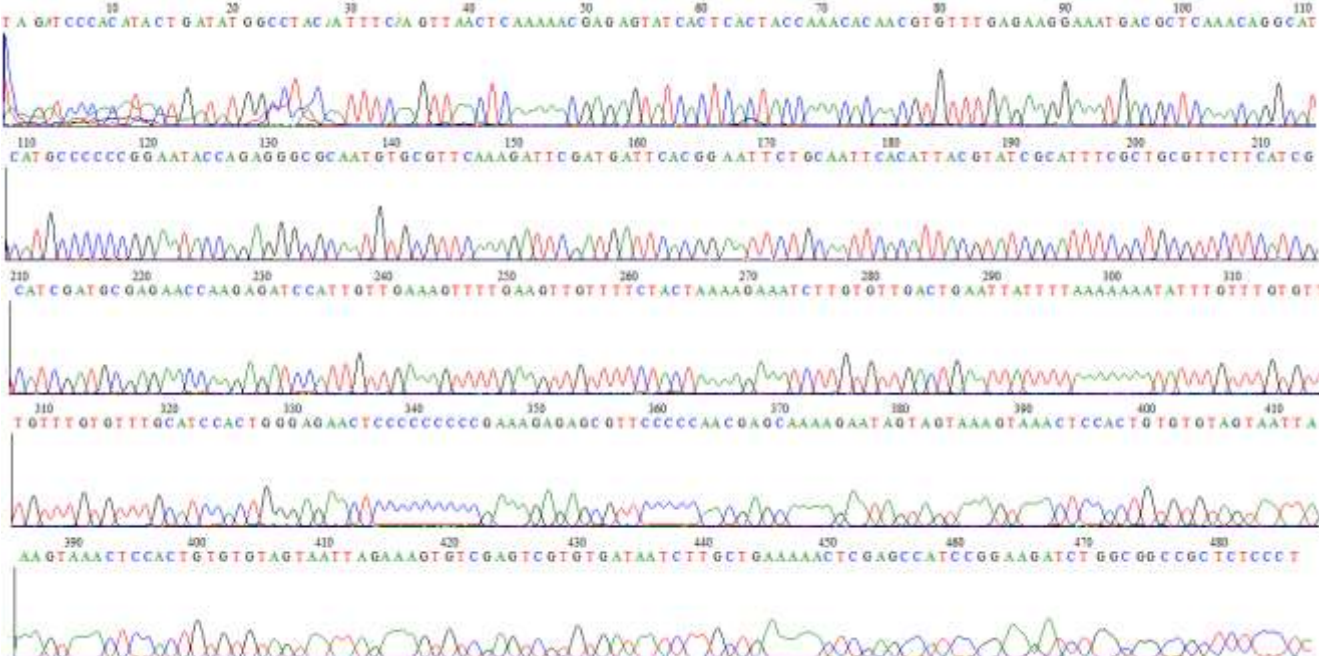
ELECTROFEROGRAMA DE PRODUCTO DE INICIADORES CGL1/CGL2 REVERSE



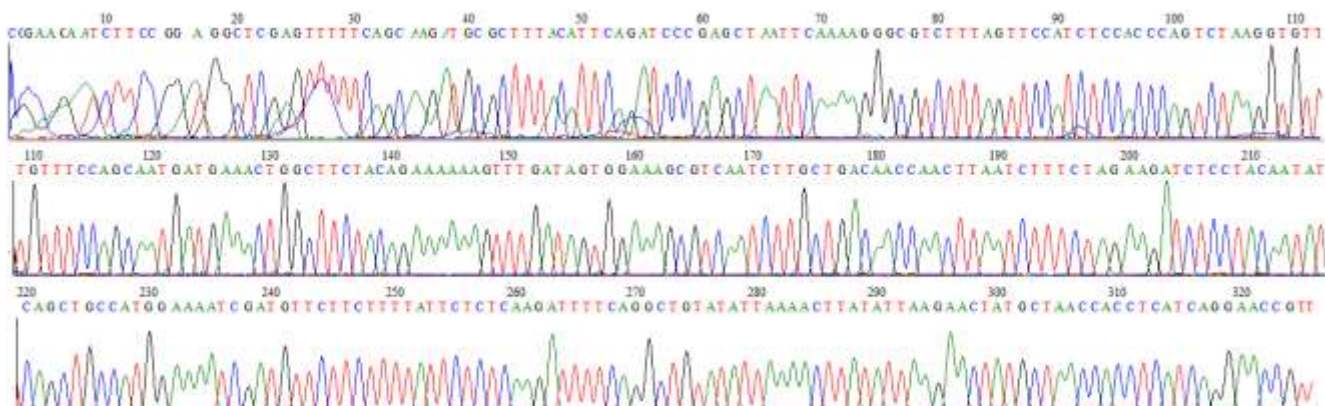
ELECTROFEROGRAMA DE PRODUCTO DE INICIADORES CALB1/CALB2 FORWARD



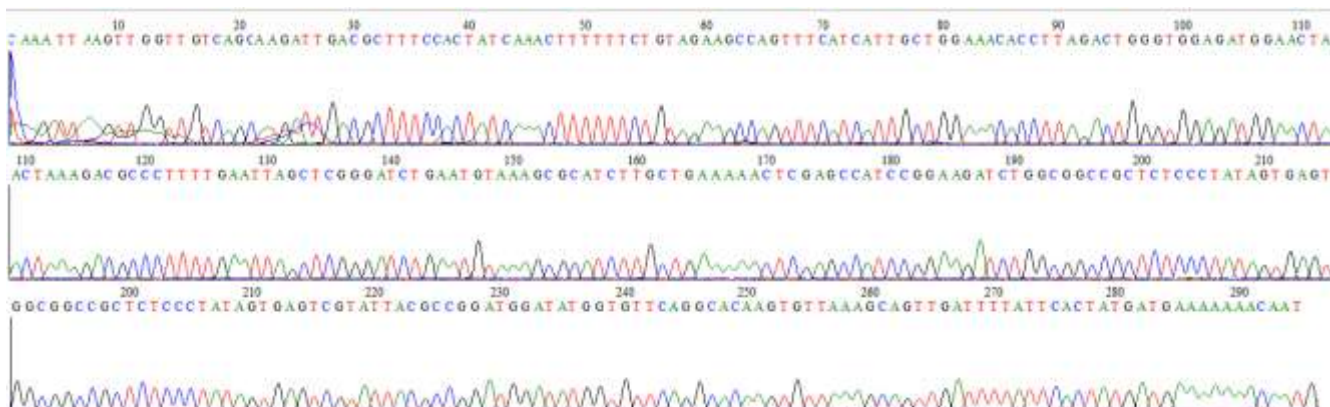
ELECTROFEROGRAMA DE PRODUCTO DE INICIADORES CALB1/CALB2 REVERSE



ELECTROFEROGRAMA DE PRODUCTO DE INICIADORES ScerF2/ScerR2 FORWARD

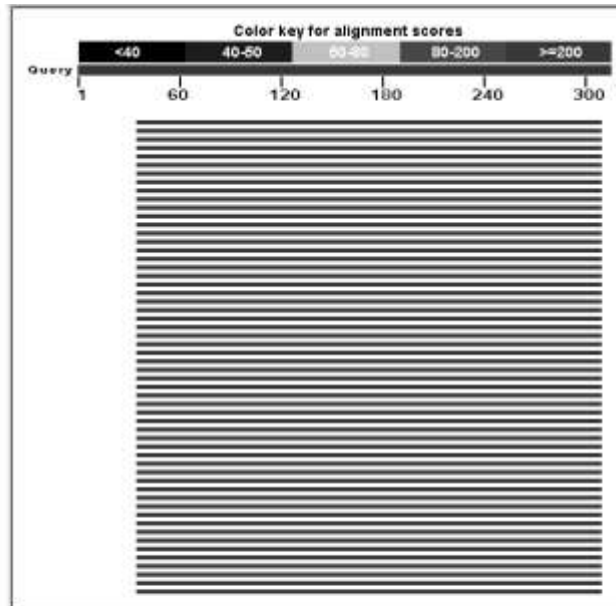


ELECTROFEROGRAMA DE PRODUCTO DE INICIADORES ScerF2/ScerR2 REVERSE



Anexo E. Alineamiento tipo BLAST de las secuencias consenso.

PRODUCTO DE PCR DE INICIADORES CALB1/CALB2



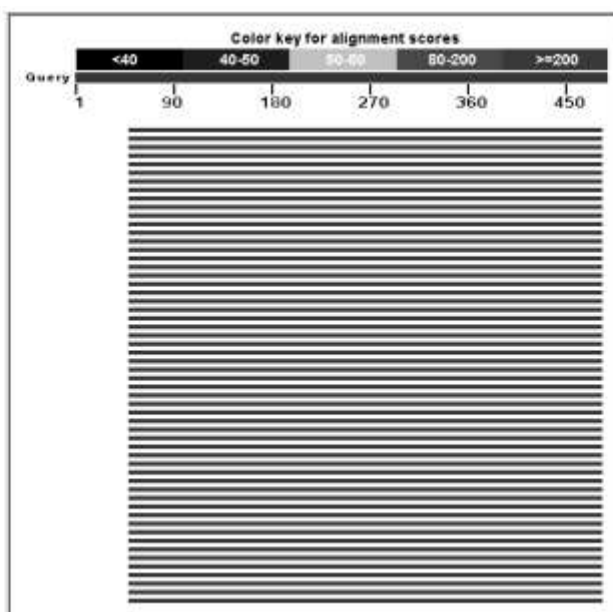
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments [Download](#) [Open in GeneBank](#) [Statistics](#) [Hide unselected results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Candida albicans strain ATCC MYA-2676 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	505	505	87%	3e-139	100%	KJ729070.1
Candida albicans strain ATCC 64124 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr	505	505	87%	3e-139	100%	KJ729060.1
Candida albicans strain ATCC 24433 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr	505	505	87%	3e-139	100%	KJ729057.1
Candida albicans strain ATCC 60193 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr	505	505	87%	3e-139	100%	KJ729049.1
Candida albicans strain ATCC 2091 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri	505	505	87%	3e-139	100%	KJ729048.1
Candida albicans strain AUMC 10273 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence,	505	505	87%	3e-139	100%	K0238265.1
Candida albicans genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, strain IQMunaf29	505	505	87%	3e-139	100%	L7577614.1
Candida albicans strain 52H188 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and	505	505	87%	3e-139	100%	KJ052044.1
Candida albicans strain AUMC 10216 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa	505	505	87%	3e-139	100%	KJ020444.1
Candida albicans isolate 262 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial s	505	505	87%	3e-139	100%	KJ0950717.1
Candida albicans isolate CS 189 ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, com	505	505	87%	3e-139	100%	KJ831888.1
Candida albicans strain NCM 3471 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, p	505	505	87%	3e-139	100%	KJ218508.1
Candida albicans clone sputum-282 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, a	505	505	87%	3e-139	100%	KJ722019.1
Candida albicans clone sputum-11P4 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence,	505	505	87%	3e-139	100%	KJ722018.1
Candida albicans strain Z7b36 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 25	505	505	87%	3e-139	100%	KJ222011.1
Uncultured Candida clone TT-1-7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer,	505	505	87%	3e-139	100%	KJ196594.1
Candida albicans strain 193 (4_0310) internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence,	505	505	87%	3e-139	100%	KJ067744.1
Candida albicans strain 142 (2_0710) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa	505	505	87%	3e-139	100%	KJ067743.1
Candida albicans strain 238 (2_0110) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa	505	505	87%	3e-139	100%	KJ067742.1

PRODUCTO DE PCR DE INICIADORES CGL1/CGL2



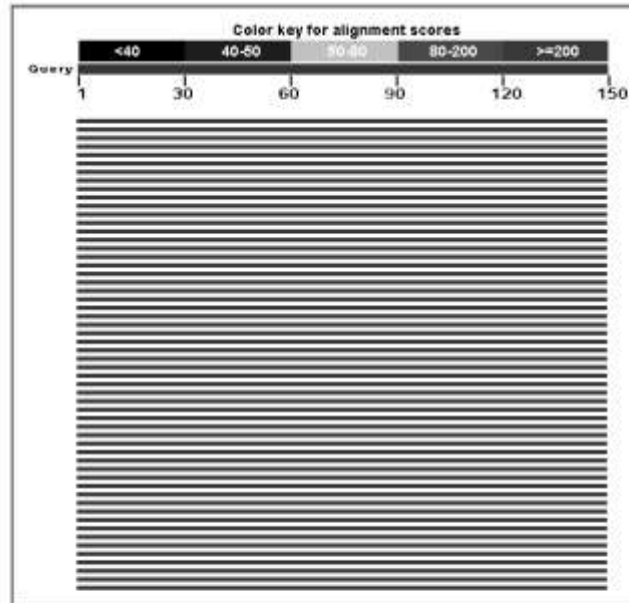
Sequences producing significant alignments:

Select: None Selected 0

Alignments Download Compare Graphics Order by: top of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> isolate s017-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence, strain FJMY018, isolate intra-strain ITS Copy 4	787	787	88%	0.0	99%	KJ020092.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> gene for 18S rRNA, ITS2, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain FJMY018, isolate intra-strain ITS Copy 4	787	787	88%	0.0	99%	LC042130.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain M352B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	787	787	88%	0.0	99%	KP675891.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain M229A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	787	787	88%	0.0	99%	KP675390.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain M132A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	787	787	88%	0.0	99%	KP675316.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain H277B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	787	787	88%	0.0	99%	KP675146.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain H226B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	787	787	88%	0.0	99%	KP674914.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain H206A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	787	787	88%	0.0	99%	KP674913.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain WM 10.109 isolate ISHAM-ITS_ID MIT92622 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	787	787	88%	0.0	99%	KP060733.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain CBS 12446 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	787	787	88%	0.0	99%	KJ000339.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> genomic DNA contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain K161018	787	787	88%	0.0	99%	HE993756.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain ATCC MYA-2950 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	785	785	88%	0.0	99%	KJ072956.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> isolate s017-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence, strain FJMY018, isolate intra-strain ITS Copy 4	785	785	88%	0.0	99%	KJ020093.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain 36/C01_0330 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	785	785	88%	0.0	99%	KT067758.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> isolate LMCRO180 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	785	785	88%	0.0	99%	KJ451710.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain 102A internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	785	785	88%	0.0	99%	KP764991.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain 90A internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	785	785	88%	0.0	99%	KP764985.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain WM 03.500 isolate ISHAM-ITS_ID MIT9960 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	785	785	88%	0.0	99%	KP131711.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain WM 283 isolate ISHAM-ITS_ID MIT92627 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	785	785	88%	0.0	99%	KP060738.1
<input type="checkbox"/> <i>Candida glabrata</i> strain 16044 isolate ISHAM-ITS_ID MIT9637 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S rDNA	785	785	88%	0.0	99%	KC488958.1

PRODUCTO DE PCR DE INICIADORES ScerF2/ScerR2



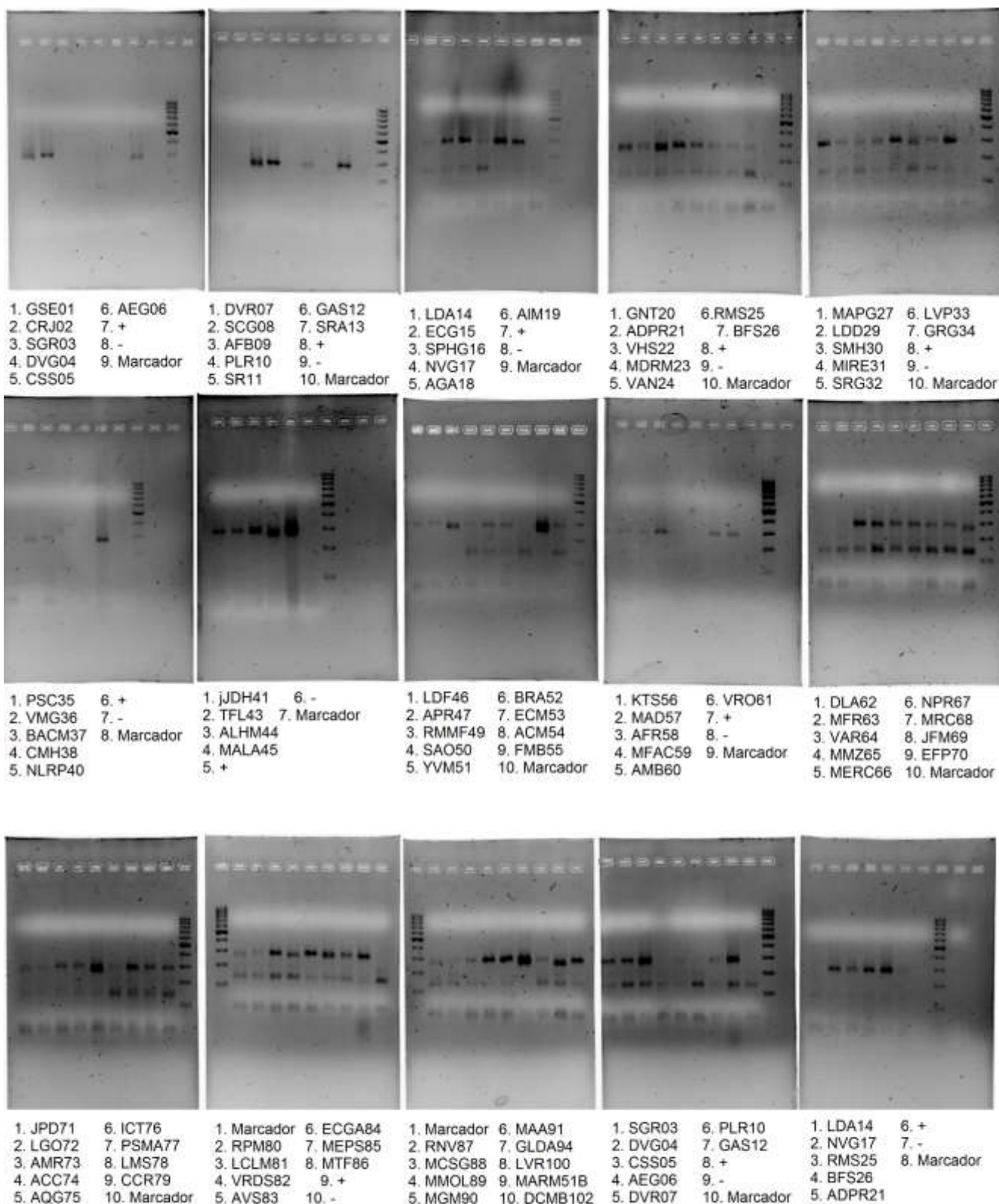
Sequences producing significant alignments:

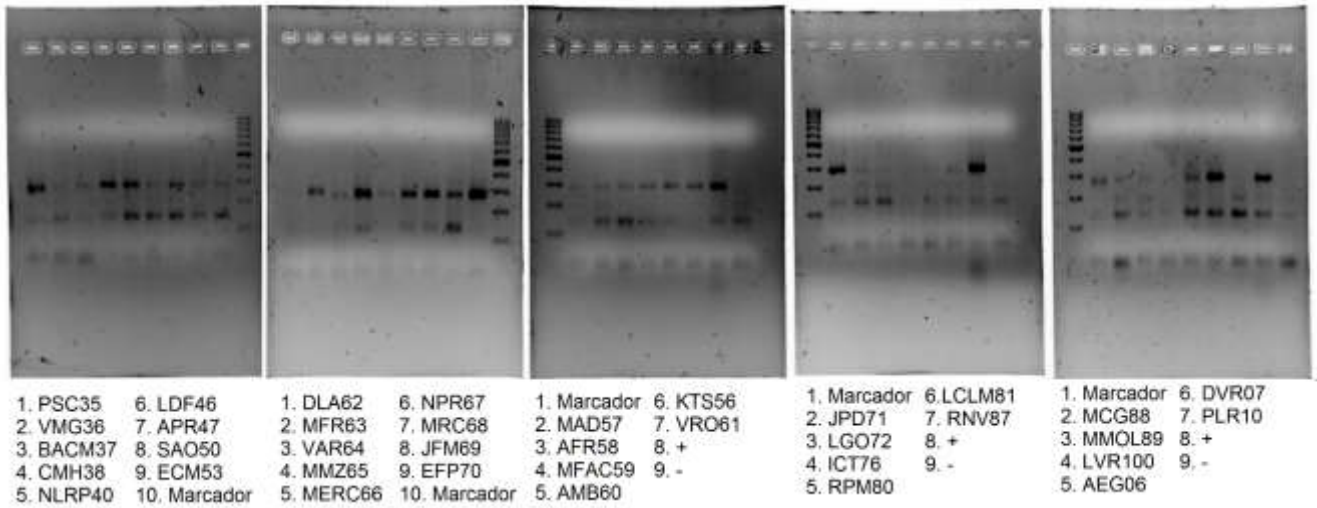
Select: All None Selected: 0

Alignments Download Compare Clustal Distance View all results

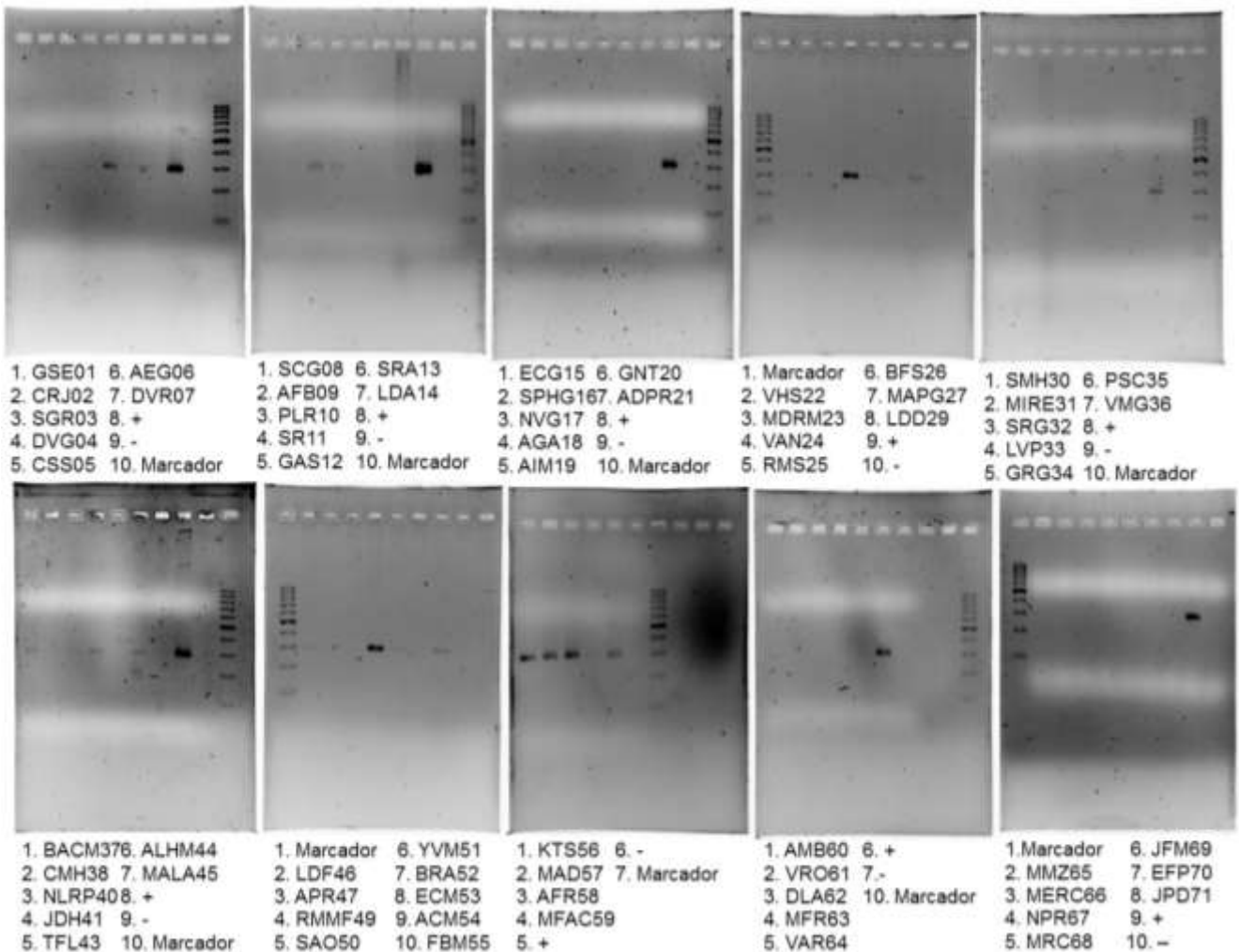
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain WBERCef_64 chromosome XVI sequence	272	272	100%	1e-69	99%	CP008217.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain HCNT1ef_18 chromosome XVI sequence	272	272	100%	1e-69	99%	CP007945.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae YJM1549 chromosome XVI sequence	272	272	100%	1e-69	99%	CP006118.2
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae YJM1388 chromosome XVI sequence	272	272	100%	1e-69	99%	CP006182.2
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae YJM1419 chromosome XVI sequence	272	272	100%	1e-69	99%	CP006191.2
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae YJM1444 chromosome XVI sequence	272	272	100%	1e-69	99%	CP006196.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain NCM1185 chromosome XVI sequence	268	268	100%	2e-68	99%	CP011825.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain NCM1167 chromosome XVI sequence	268	268	100%	2e-68	99%	CP009957.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae YJM248 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP005213.2
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae YJM1527 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP006209.2
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae YJM1355 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP006175.2
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae YJM1133 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP006156.2
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain HB_S_0MBLETTROAD_16 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP008291.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain WI_S_DAKURA_4 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP008336.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain T61 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP008119.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain HB_S_BILANCHER_12 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP008302.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain HB_S_BILANCHER_6 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP008285.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain HB_S_0MBLETTROAD_14 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP008288.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain HB_S_0MBLETTROAD_22 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP008234.1
<input type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain HB_C_OMARUMA_7 chromosome XVI sequence	267	267	100%	6e-68	99%	CP008421.1

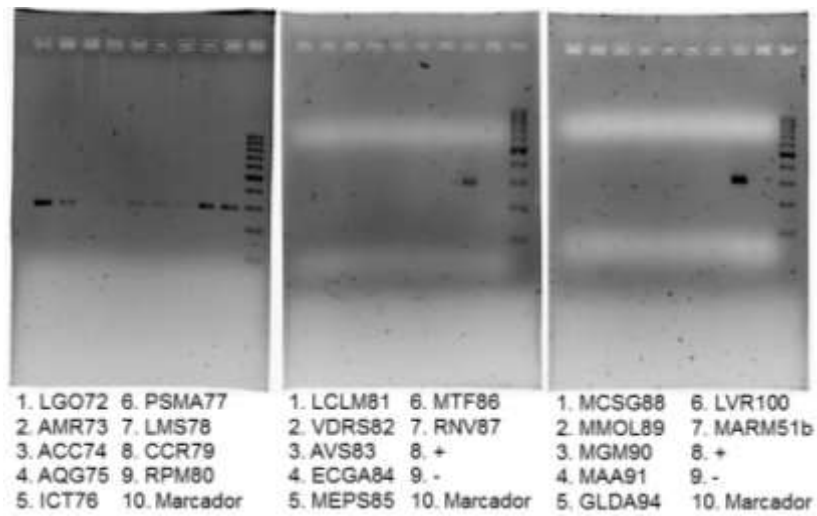
Anexo F. Geles de agarosa al 1.5% de genoteca del gen 16S ribosomal.



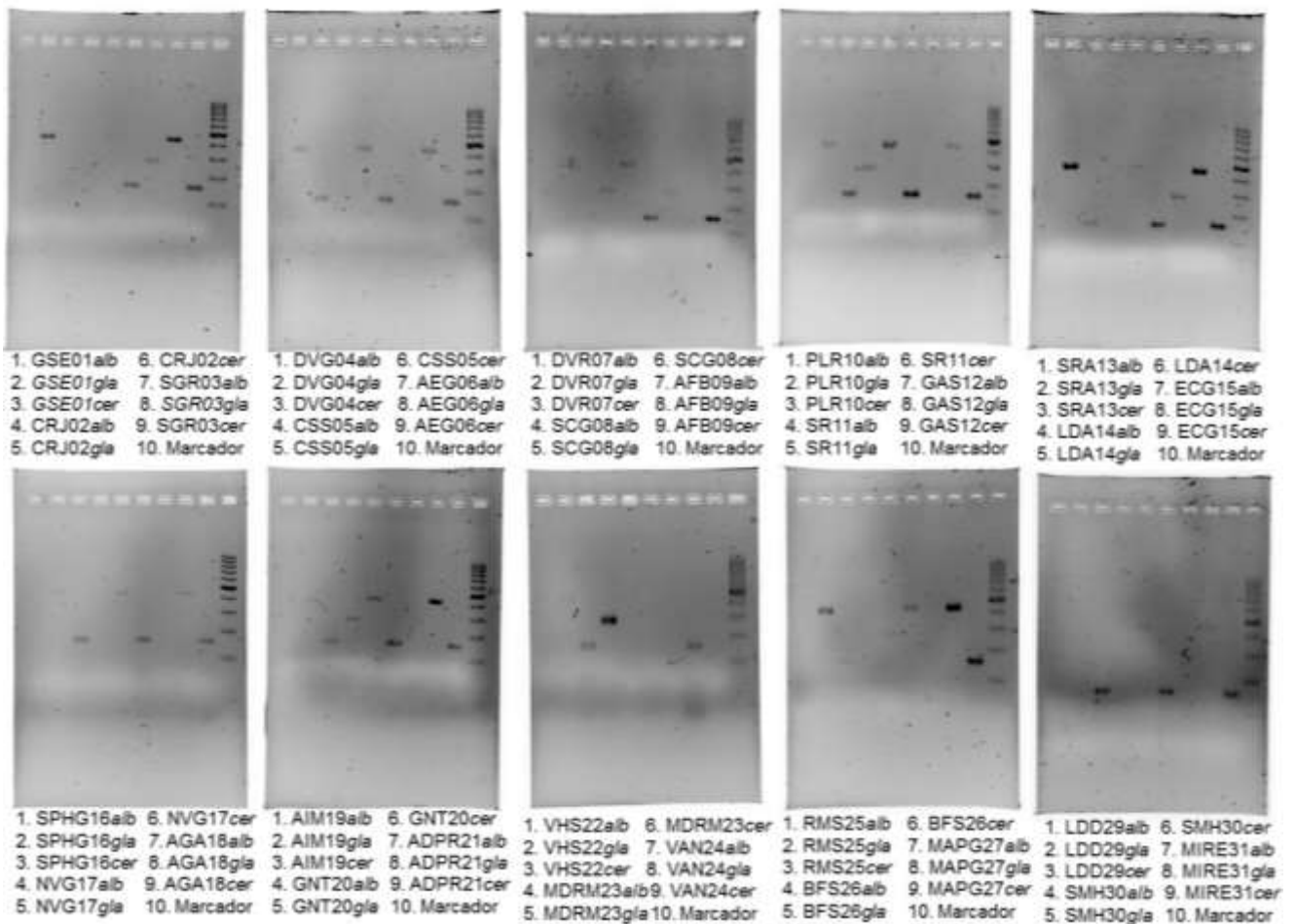


Anexo G. Geles de agarosa de 1.5% genoteca del gen 18S ribosomal.





Anexo H. Geles de agarosa al 1.5% de diagnóstico molecular de *Candida albicans* y *Candida glabrata*.





1. SRG32 *alb* 6. LVP33 *cer*
2. SRG32 *gla* 7. GRG34 *alb*
3. SRG32 *cer* 8. GRG34 *gla*
4. LVP33 *alb* 9. GRG34 *cer*
5. LVP33 *gla* 10. Marcador



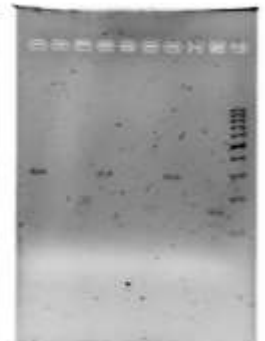
1. PSC35 *alb* 6. VMG36 *cer*
2. PSC35 *gla* 7. BACM37 *alb*
3. PSC35 *cer* 8. BACM37 *gla*
4. VMG36 *alb* 9. BACM37 *cer*
5. VMG36 *gla* 10. Marcador



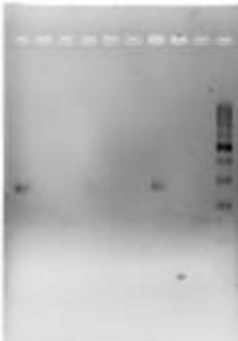
1. CMH38 *alb* 6. NLRP40 *cer*
2. CMH38 *gla* 7. JDH41 *alb*
3. CMH38 *cer* 8. JDH41 *gla*
4. NLRP40 *alb* 9. JDH41 *cer*
5. NLRP40 *gla* 10. Marcador



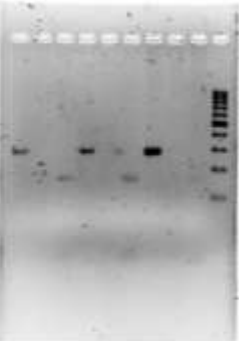
1. TFL43 *alb* 6. ALHM44 *cer*
2. TFL43 *gla* 7. MALA45 *alb*
3. TFL43 *cer* 8. MALA45 *gla*
4. ALHM44 *alb* 9. MALA45 *cer*
5. ALHM44 *gla* 10. Marcador



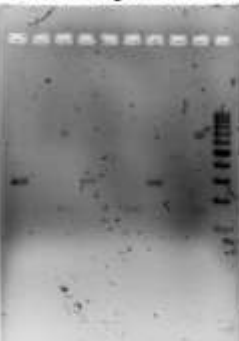
1. LDF46 *alb* 6. APR47 *cer*
2. LDF46 *gla* 7. RMMF49 *alb*
3. LDF46 *cer* 8. RMMF49 *gla*
4. APR47 *alb* 9. RMMF49 *cer*
5. APR47 *gla* 10. Marcador



1. SAO50 *alb* 6. YVM51 *cer*
2. SAO50 *gla* 7. BRA52 *alb*
3. SAO50 *cer* 8. BRA52 *gla*
4. YVM51 *alb* 9. BRA52 *cer*
5. YVM51 *gla* 10. Marcador



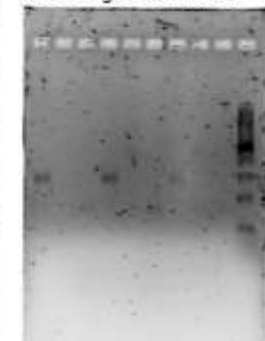
1. ECM53 *alb* 6. ACM54 *cer*
2. ECM53 *gla* 7. FBM55 *alb*
3. ECM53 *cer* 8. FBM55 *gla*
4. ACM54 *alb* 9. FBM55 *cer*
5. ACM54 *gla* 10. Marcador



1. KTS56 *alb* 6. MAD57 *cer*
2. KTS56 *gla* 7. AFR58 *alb*
3. KTS56 *cer* 8. AFR58 *gla*
4. MAD57 *alb* 9. AFR58 *cer*
5. MAD57 *gla* 10. Marcador



1. MFAC59 *alb* 6. AMB60 *cer*
2. MFAC59 *gla* 7. VRO61 *alb*
3. MFAC59 *cer* 8. VRO61 *gla*
4. AMB60 *alb* 9. VRO61 *cer*
5. AMB60 *gla* 10. Marcador



1. DLA62 *alb* 6. MFR63 *cer*
2. DLA62 *gla* 7. VAR64 *alb*
3. DLA62 *cer* 8. VAR64 *gla*
4. MFR63 *alb* 9. VAR64 *cer*
5. MFR63 *gla* 10. Marcador



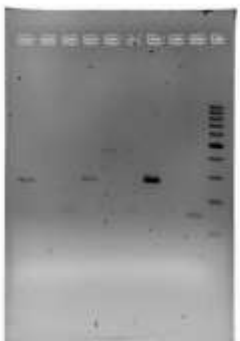
1. MMZ65 *alb* 6. MERC66 *cer*
2. MMZ65 *gla* 7. NPR67 *alb*
3. MMZ65 *cer* 8. NPR67 *gla*
4. MERC66 *alb* 9. NPR67 *cer*
5. MERC66 *gla* 10. Marcador



1. MRC68 *alb* 6. JFM69 *cer*
2. MRC68 *gla* 7. EFP70 *alb*
3. MRC68 *cer* 8. EFP70 *gla*
4. JFM69 *alb* 9. EFP70 *cer*
5. JFM69 *gla* 10. Marcador



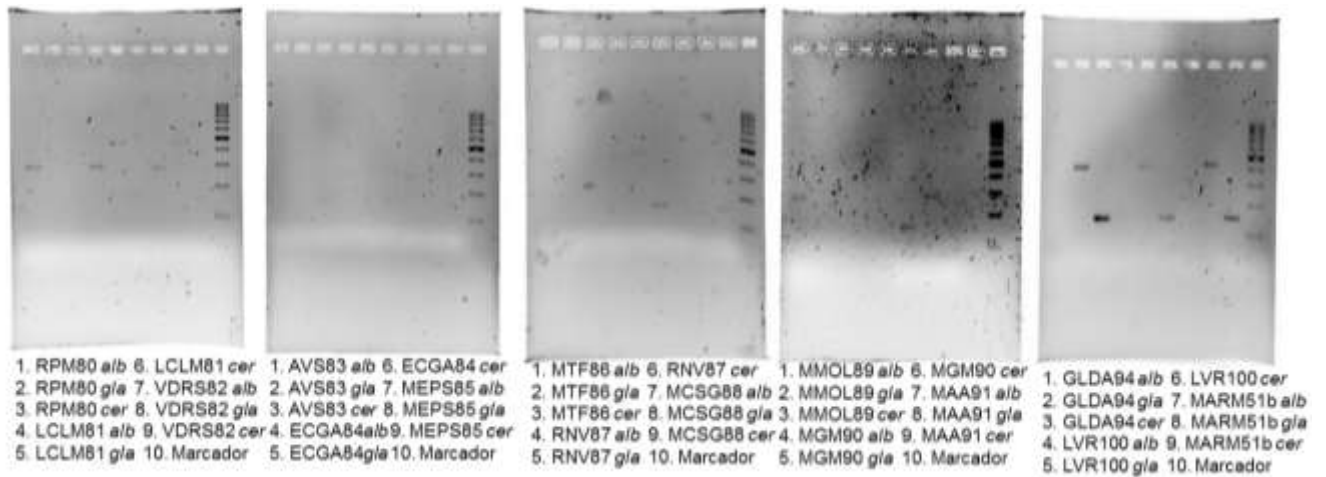
1. JPD71 *alb* 6. LGO72 *cer*
2. JPD71 *gla* 7. AMR73 *alb*
3. JPD71 *cer* 8. AMR73 *gla*
4. LGO72 *alb* 9. AMR73 *cer*
5. LGO72 *gla* 10. Marcador




1. ACC74 *alb* 6. AQG75 *cer*
2. ACC74 *gla* 7. ICT76 *alb*
3. ACC74 *cer* 8. ICT76 *gla*
4. AQG75 *alb* 9. ICT76 *cer*
5. AQG75 *gla* 10. Marcador




1. PSMA77 *alb* 6. LMS78 *cer*
2. PSMA77 *gla* 7. CCR79 *alb*
3. PSMA77 *cer* 8. CCR79 *gla*
4. LMS78 *alb* 9. CCR79 *cer*
5. LMS78 *gla* 10. Marcador



Anexo I. Cuestionario clínico aplicado a las mujeres.



Caracterización de la Microbiota Vaginal de Mujeres con Candidiasis Vulvovaginal Recurrente



Caso Número de CVV en último año: ____ Control

Nombre de la Paciente: _____

Clave de Paciente (3 Iniciales): _____ Fecha de toma de muestra: _____

Edad: ____ pH vaginal: ____ Método anticonceptivo: _____

FUM: _____ Menarca: _____ Inicio de vida sexual: ____ Parejas sexuales: _____

Gestas: _____ Partos: _____ Cesáreas: _____ Abortos: _____

Tabaquismo: Positivo Negativo

Última toma de antibiótico: Hace 1 mes Hace 3 meses Hace más de 3 meses

Antimicóticos usados en el último mes: _____

Cuadro clínico: Prurito Flujo Características: _____

Disuria Dispareunia Eritema Vulvar

Anexo J. Consentimiento Informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

“Caracterización de la Diversidad de la Microbiota Vaginal de Mujeres Mexicanas con Candidiasis Vulvovaginal Recurrente”

Investigador Principal:

DRA. YULIANA GÓMEZ MERAZ

DR. JAIME GARCÍA MENA

Le estamos invitando a participar en un estudio que es realizado por el Centro Médico ABC y el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. El objetivo es conocer la diversidad de los microorganismos que habitan la vagina de mujeres mexicanas sanas y compararlo con el de mujeres que padecen infecciones por hongos de manera recurrente, hasta cuatro veces en un solo año.

Si usted acepta la participación en el estudio le solicitaremos que nos permita estudiar muestras que tomará su ginecólogo tratante con un hisopo que se introduce en la vagina y recoge su secreción. El procedimiento se lleva a cabo siguiendo las normas de buenas prácticas clínicas y puede llevarse a cabo al mismo tiempo que su ginecólogo tome muestra para el estudio de Papanicolaou, por lo que no le ocasionará malestar adicional ni tendrá consecuencia alguna en su salud. Este estudio nos permitirá avanzar en el conocimiento de las características de las mujeres con infecciones vaginales por hongos, lo cual nos ayudará en un futuro a darles un tratamiento integral que evite la recurrencia de este padecimiento.

Para este estudio se espera que se incluyan 100 mujeres que acuden de manera regular a consulta de ginecología en el Centro Médico ABC. La participación es absolutamente voluntaria y si usted no acepta participar no se afectará su atención médica.

PROCEDIMIENTOS DEL PROTOCOLO DEL ESTUDIO

Si usted acepta participar se le tomarán las muestras vaginales que se transportarán hasta las instalaciones del Laboratorio de Referencia y Apoyo para Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco. Allí serán procesadas para la determinación de estudios genéticos sobre los microorganismos que habitan esta zona de su cuerpo.

RESPONSABILIDADES DEL MUJER

Al aceptar su participación en este estudio, se compromete a lo siguiente:

1. Autorizar la revisión de su expediente clínico, únicamente con fines de investigación (para conocer su estado de salud). La información que proporcione será estrictamente confidencial, es decir, sólo se usará con fines de investigación. Para garantizar la confidencialidad de la información, únicamente el investigador responsable tendrá acceso a la información correspondiente a su nombre y dirección.
2. Permitir que sus muestras sean procesadas en Laboratorio de Referencia y Apoyo para Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco. Si las muestras no se encuentran en condiciones necesarias para realizar las pruebas para este estudio o si usted retira su consentimiento para participar, se finalizará su colaboración en el mismo.

RIESGOS Y MALESTAR ESPERABLES

La toma de muestra con hisopo de la vagina no tiene ningún riesgo ni causa malestar adicional al que se padece en una toma para estudio de Papanicolaou.

BENEFICIOS

Los resultados del presente estudio contribuirán a estudiar y desarrollar nuevas terapias curativas y preventivas para las infecciones vaginales recurrentes por hongos. Usted recibirá el beneficio de ser informada por su ginecólogo tratante de los resultados obtenidos de sus muestras, es decir, podrá conocer la diversidad de bacterias y hongos que habitan su vagina y si esa comunidad está considerada como “sana” para una mujer en edad reproductiva.

Esperamos que la información que se obtenga con estas investigaciones pueda ayudar a conocer mejor algunos aspectos sobre este tipo de infecciones que ayuden a encontrar nuevas y mejores formas de tratamiento y prevención.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

Usted no recibirá ningún pago por donar sus muestras; entendemos esto como un regalo de su parte a la investigación. Sus muestras se utilizarán exclusivamente para los fines de investigación. De la misma forma, usted no deberá realizar ningún pago para participar en el estudio.

CONFIDENCIALIDAD

En ningún momento se conocerá su nombre, ya que a las muestras se les asignará una clave. LA INFORMACIÓN QUE SE OBTENGA DE SUS MUESTRAS SERÁ EstrictAMENTE CONFIDENCIAL.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y RETIRO DEL CONSENTIMIENTO

Usted es libre de escoger donar o no sus muestras, la donación es voluntaria. En caso de que después de haber aceptado la donación cambie de opinión, sus muestras se destruirán. En caso de haber realizado alguna investigación y si existen resultados sobre sus muestras antes de que haya cambiado de opinión, estos datos si serán utilizados. Si usted decide no donar sus muestras o cancelar su autorización no habrá ningún cambio en la atención que se le brinda en el hospital ni con sus médicos.

¿QUE PASARÁ EN EL FUTURO CON LAS MUESTRAS?

Las muestras serán almacenadas y, si usted lo permite, podrían ser utilizadas en un futuro para proyectos que en este momento no están planeados. En caso de que sus muestras se quieran analizar en un futuro, se le informará previamente sobre dicho estudio y se le solicitará su permiso mediante un nuevo Consentimiento Informado. Si no es así, las muestras se destruyen después de terminar de estudiarse.

PREGUNTAS

Es posible que existan palabras técnicas que no entiende en este documento. Por favor pregunte todo lo que no entiende y tome su tiempo para decidir hacer la donación de sus muestras.

Si antes o durante su participación en este estudio usted tiene alguna pregunta puede contactar a la Dra. Yuliana Gómez Meraz al 04455 3500 1460, correo electrónico: ygm85@hotmail.com del Centro Médico ABC o al Dr. Jaime García Mena al 5747 3800 Ext. 5327, correo electrónico: jgmena@cinvestav.mx del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad.

CONSENTIMIENTO DEL MUJER

He leído la información que se me ha dado para decidir mi participación en el “Caracterización Metagenómica de la Diversidad de la Microbiota Vaginal de Mujeres Mexicanas con Candidiasis Vulvovaginal Recurrente”. El propósito general y mi participación en particular me han sido explicados, al igual que los posibles riesgos. Al firmar este documento, doy permiso para usar mis muestras para los fines que el documento describe. Mi firma también da constancia que he recibido copia de este documento. Al firmar este documento no renuncio a ninguno de mis derechos legales.

Nombre completo de la mujer:

Fecha:

Dirección:

Teléfono:

Firma: