

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

“Salud sexual y Procreación Responsable: influencia de la anticoncepción sobre la microbiota vaginal y caracterización fenotípica y genotípica de las especies de lactobacilos colonizantes”.

TESISTA: Bioquímica Sonia Elena Maria FOSCH

DIRECTOR: Prof. Dra. Beatriz PERAZZI

CODIRECTOR: Prof. Dr. Luis PALAORO

DIRECTOR ADJUNTO: Prof. Dr. Ramón DE TORRES

✓ *Servicio de atención médica de la Comunidad de Sa Pereira*

✓ *Cátedra de Microbiología Clínica. Área Bacteriología Clínica. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.*

8/2018

“Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro”

René Descartes

Con todo mi cariño y agradecimiento a: mi compañero de vida; Juan Carlos; mis hijos Cristian y Walter; mi madre Nina; mis hermanas Silvia y María Isabel; mi hermano político Rubén; mis sobrinos y a todos los que siguen creyendo en mí, en especial Dr Omar Grosso, Dra. Beatriz Perazzi, Dra. Fatima Nader Macias, Dr Luis Palaoro y Dr. Ramón de Torres.

CONTENIDO

1. Resumen	5
2. Publicaciones	8
3. Lista de abreviaturas	11
4. Introducción	13
4.1 El tracto genital inferior	
<i>Anatomía</i>	14
<i>Histología</i>	15
<i>Composición de la secreción vaginal</i>	19
<i>Mecanismos de Defensa de la vaginal</i>	22
4.2 La microbiota vaginal	41
<i>Desbalance de la microbiota: disfunción vaginal</i>	47
<i>Infecciones del tracto genital inferior</i>	48
<i>Estudio del contenido vaginal</i>	60
4.3 Citología	
<i>Alteraciones de las Células del cérvix</i>	61
<i>Patologías del cuello uterino, factores de riesgo</i>	62
4.4 Métodos anticonceptivos; mecanismos de acción.	
<i>Anticonceptivos hormonales</i>	63

<i>Dispositivos intrauterinos</i>	64
<i>Métodos de barrera</i>	66
<i>Métodos naturales</i>	67
<i>Método de doble protección: anticoncepción-barrera</i>	68
<i>Programas de Salud sexual y Procreación Responsable</i>	68
5. Hipótesis	71
6. Objetivos del estudio	73
7. Material y métodos	75
8. Resultados-	91
9. Discusión	117
10. Conclusiones	139
11. Bibliografía	142

RESUMEN

Una elevada proporción de mujeres afronta riesgos en su salud sexual y reproductiva, la provisión de métodos anticonceptivos ha sido incorporada como una estrategia para la prevención de embarazos no deseados, abortos, infecciones y muerte. El microambiente vaginal puede ser protegido o interrumpido por muchos factores, como la anticoncepción.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de la anticoncepción sobre los estados vaginales básicos (EVBs), identificar las especies de lactobacilos cultivables vaginales, relacionar factores de riesgo y hacer un relevamiento epidemiológico de mujeres que asisten a un Centro de Atención primaria.

Materiales y métodos: se realizó un estudio prospectivo. Se incluyeron a 215 mujeres de 14 a 45 años, que respondieron el cuestionario y dieron su consentimiento para el estudio del contenido vaginal/PAP. A través del estudio de balance del contenido vaginal (BACOVA), que incluye el valor numérico de Nugent y la reacción inflamatoria vaginal (RIV), se definió cinco EVBs que se relacionaron con los métodos anticonceptivos: I) Microbiota Normal, II) Microbiota Normal con RIV, III) Microbiota Intermedia, IV) Vaginosis Bacteriana y V) Vaginitis Microbiana Inespecífica. Además, se relacionó el método de anticoncepción con levaduras y trichomonas. Se incluyeron los siguientes métodos: anticonceptivo oral combinado (ACO), dispositivo intrauterino (DIU), preservativo (PRE), ritmo (RIT) y doble protección simultánea (ACO+PRE). Se profundizó en la caracterización fenotípica (pruebas bioquímicas convencionales y espectrometría de masa) y genotípica (secuenciación del gen 16S ARNr) de las especies de lactobacilos. Se relacionaron los EVBs y factores de riesgo con la citología de cérvix.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa EPI-INFO6, versión 6.04, se aplicó la prueba de Chi-cuadrado, cálculo de Odds Ratio y prueba de Fisher. La conversión de los EVBs se evaluó mediante la prueba de McNemar. El índice de kappa se aplicó para la comparación de los métodos de identificación de lactobacilos.

Resultados: en el grupo ACO; la conversión y corrección de EVBs alterados a los 3 y 6 meses refirieron asociación estadística significativa ($p < 0,0001$) y ($p < 0,0001$) respectivamente y se obtuvo un incremento de nuevas portadoras de levaduras que resultó estadísticamente significativo ($p < 0,0001$). El DIU modificó el EVB I normal a estados alterados de VB. El PRE mostró incremento de EVBs con RIV que a los 6 meses resultó estadísticamente significativo ($p = 0,01$). El RIT y ACO+PRE mantuvieron los EVBs del inicio. La identificación de lactobacilos utilizando MALDI-TOF MS demostró 100% de

concordancia con Rep-PCR genomic fingerprinting Las especies predominantes fueron *L. gasseri*, *L. crispatus* y *L. jensenii*. Por primera vez se aisló *L. murinus* de la vagina humana. Se detectó una tendencia a la asociación de ACO con *L. crispatus*. Del estudio citológico, un 57 % de los estados de disfunción vaginal se relacionaron con citologías cervicales alteradas.

Conclusiones: Del relevamiento epidemiológico, nuestra localidad muestra una realidad social, que no difiere demasiado de jurisdicciones relegadas de nuestro país. ACO marcó una tendencia positiva de protección de la microbiota normal y corrección de sus alteraciones, que aunque se trate de un factor externo, confirma la hipótesis del factor estrógeno en la frecuencia de la disfunción vaginal. El preservativo, como factor de contacto, generó EVBs con RIV y la práctica de ritmo mostró tendencia a EVBs con MN. El uso del ACO favoreció la colonización por levaduras en mujeres sanas. La distribución de especies predominantes de lactobacilos obtenida es coincidente con otros reportes. La asociación detectada de ACO con *L. crispatus*, especie protectora de la isfunción vaginal, ha marcado una relación hormonal efectiva. El hallazgo de *L. murinus* probablemente refleje la influencia geográfica. De la comparación de MALDI-TOF MS con Rep-PCR genomic fingerprinting, el excelente grado de concordancia obtenido califica a la espectrometría de masas como una herramienta confiable y rápida para caracterizar las especies de lactobacilos vaginales. La relación de estados de disfunción vaginal con citologías cervicales alteradas probablemente evidencia afectación y/o compromiso del cérvix como estructura regional próxima.

PUBLICACIONES

Los resultados de esta Tesis forman parte de los siguientes trabajos:

- I. *“Vulvovaginitis: correlación con factores predisponentes, aspectos clínicos y estudios microbiológicos”*. Fosch Sonia, Fogolín N., Azzaroni E, Pairetti N, D'ana L, Tita L, Redona M, Gribaudo G. Revista Argentina de Microbiología (Buenos Aires) 2006; 38: 202 – 205.
- II. *“Vulvovaginitis: correlación con factores predisponentes, aspectos clínicos y estudios microbiológicos”*. Fosch S., Fogolín N., Azzaroni E., Pairetti N., D'ana L., Tita L., Redona M., Gribaudo G. Revista Colegio de Bioquímicos 1º C, Ciencia y Sociedad (Santa Fe) 2008; 5: 12 – 15.
- III. *“Influencia del método anticonceptivo en el perfil de la función vaginal en un microambiente social”*. Fosch S., Yones C., Trossero M., Grosso O. Revista Acta Bioquímica Latinoamericana (Buenos Aires) 2011; 45 (4): 763 – 72.
- IV. *“Vaginosis bacteriana: influencia de la sexualidad y anticoncepción”*. Fosch S., Yones C., Trossero M. y Grosso O. AMADA Revista de la Asociación Médica de Anticoncepción. 2012; 8 (2):35 – 40-43
- V. *“The influence of different contraceptive methods on vaginal microbiota: Clinical study”*. Fosch S., Yones C., Trossero M. y Grosso O. *Health* 5 (2013);Vol.5,No.7A4,19-24(2013)Healthdoi:10.4236/health.2013.57A4003
- VI. *“Influencia de metodos anticonceptivos sobre los estados vaginales básicos: estudio prospectivo”*.Fosch S. Yones C, Trossero M, Grosso O, Perazzi B. AMADA. Revista de la Asociación Medica Argentina de Anticoncepción. 2014; 10 (1): 26-33
- VII. *“Influence of contraception on basic vaginal states: a prospective study”*. Fosch S, Yones C, Trossero M, Grosso O, Perazzi BE. *Health* 7 (2015) Vol 7, 238-244 Published Online February 2015 in SciRes.<http://www.scirp.org/journal/health-http://dx.doi.org/10.4236/health.2015.72028>
- VIII. *“Contraception: Influence on Vaginal Microbiota and Identification of Vaginal Lactobacilli Using MALDI-TOF MS and 16S rDNA Sequencing”*. Fosch SE, Fico seco CA, Marchesi A, Cocucci S, Nader-Macias MEF, Perazzi BE. *The Open Microbiology Journal*,

2018, 12: 218-229. Electronic publication date: 29/06/2018] [Collection year: 2018] -
Publisher Id: TOMICROJ-12-218] - [DOI: 10.2174/1874285801812010218]

IX. "Vaginal states: recognition of conversion processes in women using contraception and characterization of vaginal lactobacilli species". Sonia Elena Maria Fosch, Marta Trossero, Omar A. Grosso, Silvina Cocucci, Sandra Payalef, Beatriz E. Perazzi. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. Enviado noviembre 2018. Enviado



ABREVIATURAS

- CG: Células guía ó Clue cells
- CV: Contenido vaginal
- DV: Disfunción vaginal
- EVB: Estado vaginal básico
- Le: Levaduras
- MEF: Mujer en edad fértil
- Mex: Morfotipos extraños
- MI: Microbiota intermedia
- MM: Mujer menopáusica
- MN: Microbiota normal
- MPB: Manual de Procedimiento BACOVA
- RIV: Respuesta inflamatoria vaginal
- TV: Trichomonas
- VB: Vaginosis bacteriana
- VMI: Vaginitis microbiana inespecífica
- VN: Valor numérico

INTRODUCCIÓN

El tracto genital inferior

Anatomía

El tracto genital inferior femenino está formado por el cuello uterino, la vagina y la vulva (Figura 1). El cuello uterino conforma la porción inferior del útero; está delimitado arriba por el istmo y protruye en la vagina. Se divide en la porción vaginal, o exocérvix, y el canal, o endocérvix. El exocérvix presenta dos labios —el anterior y el posterior— delimitados por el orificio cervical externo¹.

La irrigación arterial del cuello está dada por ramas de la arteria uterina y la venosa es paralela a la arterial. La red linfática nace cerca de la mucosa y en la profundidad del estroma, en tanto que la inervación está presente en la porción externa del exocérvix y en el endocérvix, y proviene del sistema autónomo².

La vagina es una estructura tubular, generalmente colapsada, que se extiende desde el vestíbulo vulvar hasta el cuello uterino. Su longitud es de aproximadamente 8 cm y se ubica detrás de la vejiga y de la uretra y delante del fondo de saco de Douglas y del recto. En la unión con el exocérvix, forma un canal circular alrededor del cuello que se denomina ‘domo vaginal’, ‘bóveda’ o ‘fórnix’. Para su estudio se la divide en cuatro fondos de saco: uno anterior, dos laterales y uno posterior, que se continúan sin transición. La irrigación sanguínea arterial es provista por ramas de la arteria iliaca interna; la venas rodean a la vagina y drenan a la vena ilíaca interna. La red linfática es compleja y drena hacia los ganglios ilíacos externos, los glúteos inferiores, los sacros, los anorrectales y los inguinales. La inervación es suministrada por el plexo hipogástrico superior y por el plexo sacro^{2,3}.

La vulva —o los genitales externos— se extienden por delante del himen e incluye el monte pubiano, en tanto que por detrás llega al ano y lateralmente a ambos surcos inguinales. Está integrada por el monte de Venus, los labios mayores, los labios menores, el prepucio, el frenillo, el clítoris, el vestíbulo, el meato uretral, las glándulas de Bartolino y Skene, el himen y el introito vaginal².

La irrigación sanguínea es provista por la arteria pudenda, externa e interna, mientras que el drenaje linfático de la vulva fluye hacia los ganglios linfáticos inguinales y femorales. La inervación depende de los nervios iliohipogástricos, ilioinguinales, genitofemoral y perineales⁴.

Figura 1 *Órganos del tracto genital*



Histología

El cuello uterino tiene dos porciones bien delimitadas: el exocérvix y el canal endocervical. El exocérvix está tapizado por un epitelio escamoso no queratinizado, similar al epitelio vaginal que, a su vez, se divide en tres estratos: el basal (germinal)/parabasal, el medio, o estrato espinoso, y el superficial. Por debajo de este epitelio escamoso se encuentra el tejido conectivo, compuesto por una fina vascularización que nutre al epitelio suprayacente; además, allí se encuentran terminaciones nerviosas⁴.

En la edad reproductiva, la acción de los estrógenos y de la progesterona produce el crecimiento, la maduración y la descamación del epitelio. Este se renueva en un lapso de cuatro o cinco días, y si se le agregan estrógenos exógenos, este lapso se reduce a tres⁴.

El canal endocervical está tapizado por una hilera de células cilíndricas muciparas que revisten la superficie y las estructuras glandulares, y estas últimas son invaginaciones tortuosas del epitelio superficial, no glándulas verdaderas. Las células cilíndricas presentan un núcleo basal y un citoplasma alto, finamente granular, lleno de pequeñas vacuolas mucinosas constituidas por mucopolisacáridos. También cabe observar la presencia de

células cilíndricas ciliadas, que se encargan del transporte del moco y de las células argentafines, cuya función aún se desconoce⁵.

Por debajo del epitelio cilíndrico mucíparo hay una gruesa rama de vasos capilares conformada en un estroma y que presenta mayor inervación que el exocérvix. Tanto en el endocérvix como en el exocérvix se hallan folículos linfoides con o sin centro germinativo, con linfocitos T responsable de la respuesta inmune. En el interior del epitelio pavimentoso de exocervix, intercaladas entre sus mismas células se encuentran las células de Langerhans, presentadoras profesionales de antígenos⁶.

El moco producido por dicho epitelio también responde al estímulo hormonal. Los estrógenos generan estimulación de las células, lo que da como resultado un moco abundante, alcalino y acuoso que facilita la penetración espermática. La progesterona, por otro lado, produce una disminución del moco, que es ácido y grueso, y posee numerosos leucocitos que impiden la penetración espermática⁶.

La unión escamocolumnar constituye el punto en el cual el epitelio escamoso del exocérvix se une al epitelio cilíndrico del endocérvix. En el momento del nacimiento de una persona, el punto de unión entre el epitelio escamoso y el cilíndrico se encuentra en el orificio cervical externo y se llama 'unión escamocolumnar original'. El desarrollo del cuello uterino durante la infancia y la pubertad produce su alargamiento, con la consiguiente salida del epitelio mucíparo, que forma un ectropión fisiológico, el cual presenta su máximo desarrollo durante la menarca y los primeros años de la vida reproductiva⁶.

Posteriormente, el epitelio mucíparo es reemplazado por un epitelio semejante al escamoso, derivado de las células de reserva de endocervix, que nuevamente se encuentra con el epitelio cilíndrico en el orificio cervical externo, y que ahora se llama 'unión escamocolumnar fisiológica' o 'funcional'. Esa zona, comprendida entre la unión original y la funcional, se llama 'zona de transformación', y es el lugar de asiento de todas las lesiones precursoras del cáncer de cuello de útero⁶. Por otra parte, se llama 'metaplasia escamosa' al reemplazo del epitelio mucíparo por el epitelio escamoso, y el resultado de ese proceso constituye un epitelio semejante al escamoso maduro (ya que es caracterizado por moléculas de citoqueratinas diferentes) que responde a los estímulos hormonales⁶.

Al analizar la histología de la vagina nos encontramos con que esta tiene la pared constituida por tres capas; la *mucosa*, la *muscular* y la *adventicia*. La mucosa se dispone de manera rugosa y forma pequeños pliegues de 2 a 5 mm de espesor según el estímulo hormonal. Esta mucosa está a su vez revestida por un epitelio escamoso estratificado que, en general, es no queratinizado; además contiene glucógeno y está dividido en las siguientes capas:

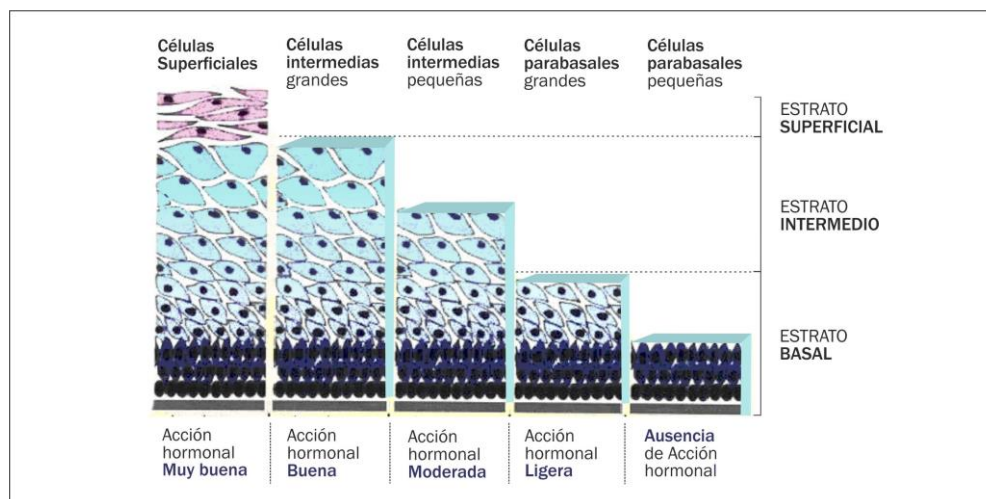
- ✓ **Basal:** una hilera de células pequeñas (14-20 μ) con citoplasma escaso e intensamente cianófilo, con bordes lisos y definidos, núcleo central redondo, relativamente grande e hipercromático⁶.
- ✓ **Parabasal:** dos a cinco hileras de células pequeñas (15-30 micras), poliédricas o elípticas, con citoplasma cianófilo y bordes celulares muy bien definidos, y con núcleos redondos u ovales de entre 8-12 micras. Suelen ser vitales, es decir, tienen una cromatina reconocible y uniformemente distribuida. En ocasiones pueden presentar citoplasmas eosinófilos y núcleos pequeños y picnóticos como consecuencia de una rápida maduración provocada por una intensa acción estrogénica o irritativa⁶.
- ✓ **Intermedia:** de espesor variable con células grandes (30-50 micras) aunque algo menos que las superficiales; con citoplasma transparente, poligonal y de bordes plegados. La tinción suele ser pálida verde-azulada (cianófila). Los núcleos son redondos u ovales, mayores que los de las células superficiales (9-11 micras), de apariencia vesicular y cromatina fina. Las células intermedias tienden a mostrar citólisis en la fase progestacional por acción de la flora lactobacilar. El glucógeno contenido en ellas es convertido en ácido láctico por acción de la bacteria⁶.
- ✓ **Superficial:** de espesor variable; las células son grandes (40-60 micras), poligonales, de bordes citoplasmáticos bien definidos e irregulares. El citoplasma es translúcido, homogéneo, preferentemente eosinófilo, y ocasionalmente puede mostrar gránulos de queratohialina alrededor del núcleo. Los núcleos son pequeños (5-7 micras), centrales y redondos, la mayoría picnóticos. Las células superficiales alcanzan su máximo porcentaje durante la madurez sexual, cuando el efecto estrogénico es más intenso (fase ovulatoria) y en casos de acción hormonal hiperestrogénica (persistencia del folículo y tumores funcionantes, entre otras causas)⁶.

El epitelio escamoso vaginal responde al estímulo hormonal ya que contiene receptores intranucleares para esteroides sexuales (Figura 2). Es por ello que el espesor y la

maduración del epitelio varían en cada ciclo menstrual (Figura 3). El estímulo estrogénico incrementa el espesor del epitelio, y el progestacional lo hace madurar cargándolo de glucógeno. Por debajo del epitelio se encuentra la lámina propia, compuesta por un tejido conectivo con abundantes fibras elásticas y nervios, y en el que se observan escasos vasos sanguíneos. La capa muscular está constituida por fibras lisas que se disponen de manera circular en el sector pegado a la mucosa y de manera longitudinal en la parte externa.

Se observa que las dos capas no están bien delimitadas, y que algunas de las fibras longitudinales mencionadas forman los ligamentos cardinales. La adventicia está constituida por un tejido conectivo laxo, vascularizado con abundantes terminaciones nerviosas, fundamentalmente de tipo vasomotor, y con relativa abundancia de neurotransmisores, tal como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido histidina metionina (PHM), el neuropéptido Y (NPY), el óxido nítrico (NO) que pueden desempeñar un papel relevante en el control del flujo sanguíneo y la permeabilidad capilar en la vagina humana.^{6,7} El epitelio y la lámina propia forman una serie de pliegues transversales (rugae) más prominentes en el segmento inferior, y que se atenúan considerablemente tras la menopausia por el cese del estímulo estrogénico.

Figura 2 Estructura del epitelio vaginal en función de la acción de las hormonas sexuales



(Adaptada: Hans Friedrich Nauth 2005)

Figura 3 Grado de proliferación del epitelio vaginal en función del ciclo hormonal



(Adaptada: Hans Friedrich Nauth 2005)

Composición de la secreción vaginal

Aunque la vagina y el cuello uterino carecen por completo de formaciones glandulares, la superficie vaginal está humedecida por una película de líquido formada, en su mayor parte, por un trasudado del plasma sanguíneo procedente de los lechos capilares de la lámina propia (Figura 4). La composición iónica de este líquido se modifica al atravesar el epitelio vaginal: se reabsorbe parte del Na^+ (lo que limita la salida de agua hacia la luz) y se añade K^+ . De este modo, las concentraciones de estos iones Na^+ y K^+ en el líquido vaginal, en ausencia de excitación sexual, corresponden respectivamente a la mitad y a unas 5 o 6 veces la del plasma⁸.

La capacidad de transferencia de líquido a través del epitelio vaginal es facilitada por los estrógenos; esta disminuye tras la menopausia y parece ser mediada por el NO , cuyas enzimas productoras abundan en el epitelio vaginal. El líquido de humidificación vaginal, en ausencia de excitación, tiene una elevada concentración de H^+ (pH de 3,5 a 4,5) durante todo el ciclo, así como en las mujeres premenopáusicas, excepto durante la menstruación, en que se asemeja al líquido plasmático por la presencia de sangre y otros productos de la descamación endometrial⁸.

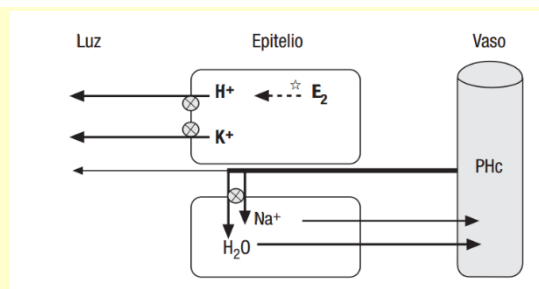
Estudios recientes han documentado una importante actividad de bombeo de protones (por una H⁺-ATPasa) en la membrana apical (luminal) de las células de los epitelios vaginal y cervical. Esta actividad es estimulada por los estrógenos y disminuye tras la menopausia, por ello se acompaña con un aumento del pH vaginal (considerado clínicamente como signo de atrofia)⁹.

Además del contenido iónico, la secreción vaginal está compuesta por proteínas/péptidos, glicoproteínas, ácido láctico, ácido acético, glicerol, urea y glucógeno, elementos que varían dependiendo de los niveles absolutos y de las relación de los estrógenos con la progesterona, de la estimulación sexual y del estado de microbiocenosis¹⁰. En la secreción vaginal también se encuentran células exfoliadas según el perfil hormonal. Bajo la estimulación con estrógenos, predominan las células de la capa superficial, y en la fase de luteínica lo hacen las células de la capa intermedia¹⁰.

Las células epiteliales vaginales —principalmente las intermedias— contienen glucógeno, que abastece y nutre a las principales bacterias de la microbiota vaginal normal (lactobacilos). Estos bacilos, al degradar el glucógeno y generar ácido láctico, también crean un ambiente ácido, lo que restringe el crecimiento de microorganismos patógenos (Figura 5)¹¹. Por lo tanto, a la edad fértil, cuando el epitelio vaginal está bajo la influencia de estrógenos y de progesterona, varios factores contribuyen a la acidez protectora de la vagina y el pH normal varía de 3,5 a 4,5, con un valor típico de 4,2¹¹. La secreción vaginal también contiene componentes antimicrobianos del sistema inmunitario y leucocitos^{12, 13}.

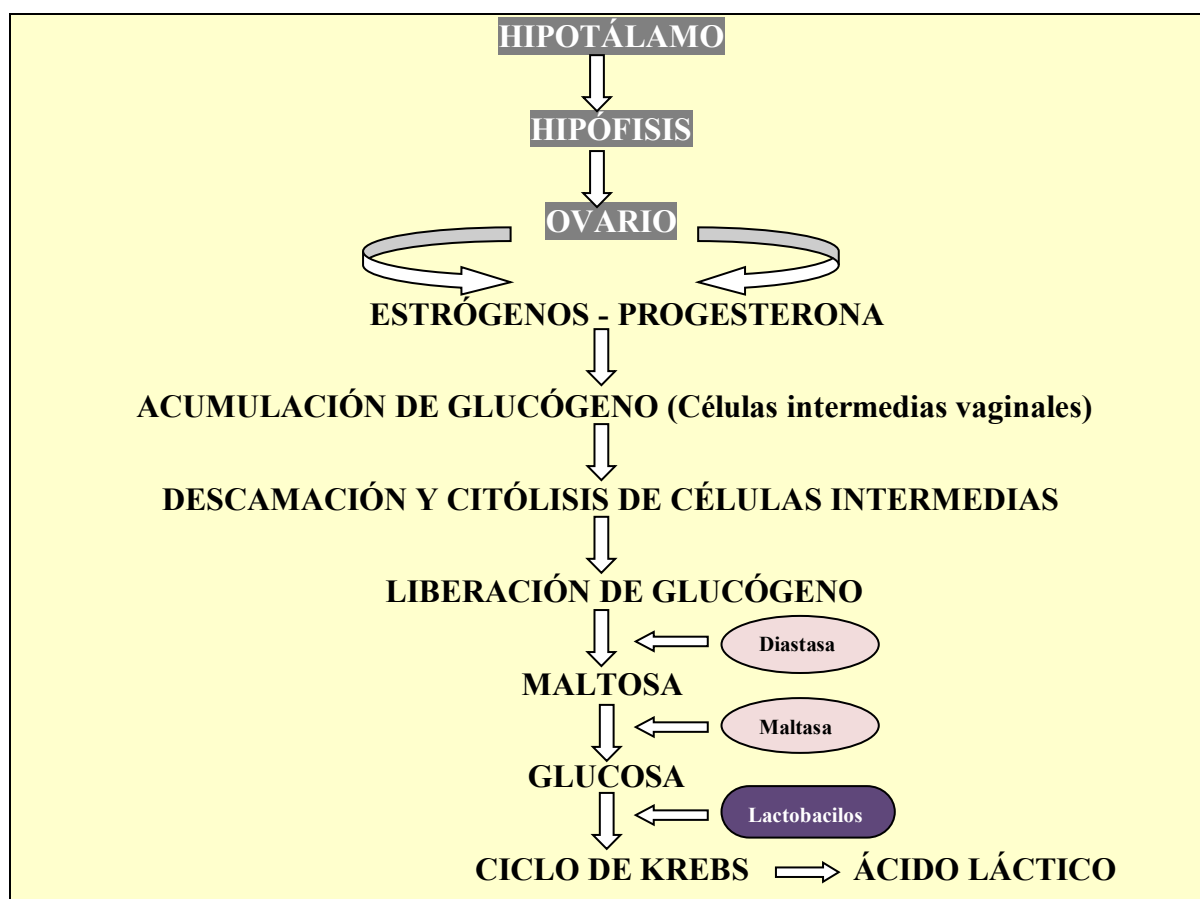
Queda aún por dilucidar cuál de los mecanismos es más importante para mantener la acidez fisiológica de la vagina, si la bomba de protones (Figura 4) o la degradación del glucógeno por los lactobacilos (Figura 5).

Figura 4 *Mecanismos de transferencia de líquido a través de la pared vaginal.*



La presión hidrostática en los capilares (PHc) de la lámina propia determina que una parte del plasma, desprovisto de proteínas, salga fuera de ellos y atraviese el epitelio vaginal adyacente. A) En ausencia de excitación, las células epiteliales modifican significativamente la composición de este ultrafiltrado plasmático: reabsorben parte del Na^+ (acompañado por agua, lo que reduce el volumen de líquido extravasado a la vagina) y le añaden K^+ y H^+ (acidificando la vagina). Los estrógenos (E_2) contribuyen a este proceso de diversas formas (líneas de puntos): estimulan el bombeo de H^+ hacia la luz vaginal y aumentan la capacidad de transferencia de líquidos del epitelio (Adaptada M.Mas 2007).

Figura 5 Regulación del pH vaginal: participación de los lactobacilos



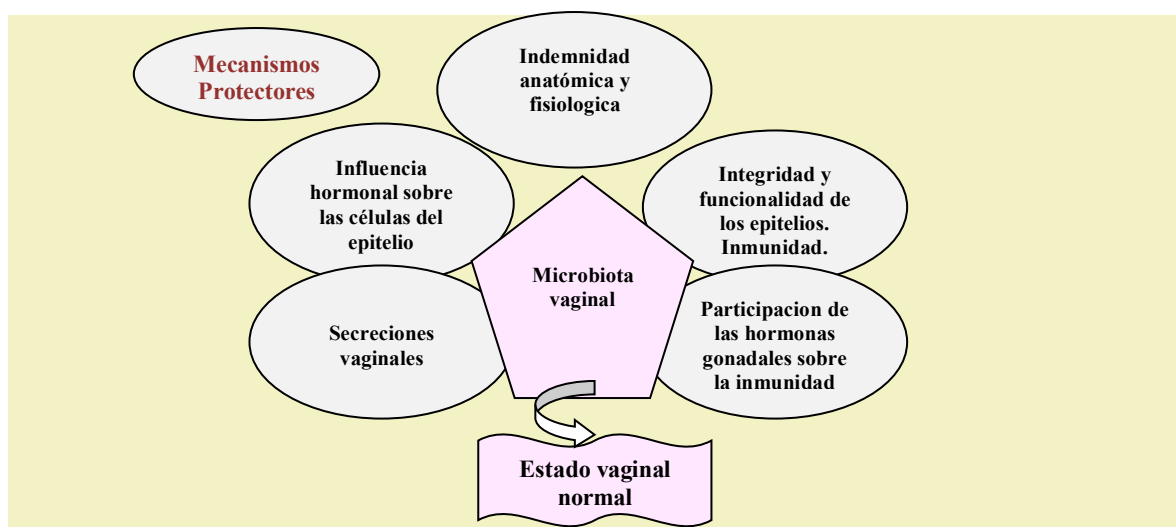
Al líquido de humectación vaginal de reposo se añaden también las secreciones mucosas producidas por el epitelio columnar del cuello vaginal, lo que le confiere un tacto sedoso⁹. Ese moco cervical, que tiene un pH de aproximadamente 8,0, contribuye también a la secreción vaginal y evita físicamente que los microbios se adhieran a la superficie de la mucosa¹⁴; este se compone de agua (92-98%), glicoproteínas (mucina), iones, proteínas y polipéptidos antimicrobianos, tales como lactoferrinas, lisozimas, inmunoglobulinas y defensinas¹².

El alto peso molecular más distintivo de la secreción cervical se constituye por las mucinas formadoras de gel, que son grandes moléculas poliméricas¹⁵. Entre las mucinas identificadas en las secreciones endocervicales, se encuentran las siguientes: MUC5B, MUC5A, MUC6, MUC16 y MUC1 transmembrana^{16, 17}. El moco secretado también está bajo control hormonal, y los cambios en viscosidad puede ser vistos durante el ciclo menstrual^{15, 18}. Cabe destacar que la capacidad de las bacterias para degradar moléculas de mucina por las enzimas microbianas (mucinasas, sialidasas) es a menudo un paso fundamental en la interrupción de la barrera mucosa defensiva, ya que estas constituyen interfaces directas entre el medio interno y el externo^{10, 19}.

Mecanismos de defensa de la vagina

La vagina representa un ecosistema dinámico que se mantiene en equilibrio gracias a una fina interacción de factores, como una microbiota diversa y variable con mecanismos protectores vaginales, entre los que se destacan: 1) indemnidad anatómica y fisiológica de la vulva y del periné, 2) influencia hormonal sobre las células del epitelio, 3) secreciones vaginales, 4) integridad y funcionalidad de los epitelios, inmunidad y 5) participación de las hormonas gonadales sobre la inmunidad (Figura 6).

Figura 6 *Microambiente vaginal*



✓ ***Indemnidad anatómica y fisiológica***

La vulva y el periné, con la correcta convergencia de los labios menores, mantienen la barrera de defensa mecánica que separa el ambiente vaginal del externo, y conservan así las condiciones apropiadas de humedad, temperatura y pH².

✓ ***Influencia hormonal sobre el epitelio vaginal***

Las hormonas reproductivas influyen principalmente sobre la capa intermedia y superficial del epitelio escamoso del exocérvix y de la vagina. En respuesta al estradiol, se genera un epitelio con un espesor máximo en la fase folicular de 45 capas de células, y en la fase lútea, de 30 capas, con elevado contenido de glucógeno que provee la cantidad de sustrato para la producción del ácido láctico para la defensa de un pH protector^{6,7}.

Los estrógenos tienen como función principal fomentar la proliferación y el crecimiento de los tejidos en los órganos relacionados con la reproducción, así como promover el desarrollo de la mayor parte de los caracteres sexuales secundarios. Entre otras funciones, además, aumentan el volumen de la vagina y modifican su epitelio, y son responsables de los cambios que ocurren en el endometrio durante el ciclo menstrual. La mucosa vaginal, ante el estímulo del estrógeno experimenta un proceso de cornificación en sus células epiteliales, que se enriquecen de glucógeno²⁰.

En el aparato reproductor femenino, los estrógenos se sintetizan en los ovarios, principalmente a partir del colesterol que hay en la sangre, aunque otros tejidos participan igualmente en la producción como, por ejemplo, las glándulas mamarias²⁰.

El principal estrógeno es el estradiol, que resulta directamente de la conversión de la testosterona mediante un proceso enzimático denominado 'aromatización', dirigido por la enzima aromatasas. El estriol y la estrona son otras dos sustancias estrogénicas generadas en pasos alternos de ese proceso, pero sus efectos son menos intensos que los del estradiol.

La secreción del estradiol al plasma es variable a lo largo del ciclo menstrual, con unos valores de alrededor de 30 pg/mL en la fase folicular temprana y de 300 pg/mL en fase la periovulatoria, mientras que disminuyen marcadamente en los 2 o 3 días siguientes a la ovulación y alcanza valores menores de 200 pg/mL durante la fase lútea²⁰. En el plasma circula unido en un 40% a la SHBG (proteína transportadora de hormonas sexuales), y el

58% del estradiol se une a la albúmina —entre el 2% y el 3% circula libre y, por lo tanto, en forma biológicamente activa.

El otro estrógeno destacado es la estrona que, si bien no juega un papel importante durante el ciclo menstrual —pues el folículo produce un 95% de estradiol—, se convierte sin embargo en el estrógeno dominante a partir de la menopausia. Su procedencia fundamental es de la conversión periférica en el tejido celular subcutáneo de la androstendiona producida en las células teca-ováricas, en las glándulas suprarrenales o del propio estradiol. Los estrógenos actúan sobre diversos tejidos del organismo mediante su interacción con receptores nucleares específicos siguiendo una serie de mecanismos²⁰.

Tanto las hormonas sexuales de producción endógena (en el mismo cuerpo) como las propiciadas por administración exógena actúan sobre la mucosa vaginal; de ahí que la forma de administración no tenga ninguna importancia en cuanto al logro del efecto deseado. Como mecanismo de protección, las hormonas llegan a través de los receptores celulares al núcleo en forma activada y en pocos minutos estimulan la proliferación del DNA; acto seguido, desarrollan su efecto estimulante provocando la multiplicación del epitelio, y así se garantiza una buena concentración de glucógeno en las células intermedias, lo que constituye un punto clave para el mantenimiento de un pH protector²¹.

Los estrógenos son de carácter lipídico —es decir que proceden del colesterol—, por lo que atraviesan la membrana plasmática con relativa facilidad. Sin embargo, son retenidos con alta especificidad y afinidad en células de tejidos blancos, como el útero y los ovarios, entre otros, por ciertas proteínas de unión que se encuentran en el núcleo celular, llamadas ‘receptores a estrógenos’²⁰.

Los receptores a estrógenos (REs) son moléculas de naturaleza proteica, lo que significa que están formadas por aminoácidos, y pertenecen a la familia de los receptores nucleares de hormonas esteroides. Todos los miembros de esta familia muestran cierto grado de similitud en cuanto a su estructura primaria (o sea, a su secuencia de aminoácidos). Por otro lado, toda molécula que pueda unirse al receptor se la conoce como ‘ligando’²⁰.

El RE fue identificado hace aproximadamente cuarenta años, en 1962, año en que Jensen *et al.* describieron la presencia de sitios de unión de estrógeno en diferentes tejidos de ratas²². Cuatro años más tarde, Toft y Gorski aislaron por primera vez receptores de

estrógeno del útero de ratas²³. Ambos grupos de investigadores desarrollaron distintos modelos para explicar cómo el estradiol lleva a cabo su acción a nivel del núcleo al unirse a un receptor específico. Desde entonces, este fenómeno ha sido ampliamente estudiado. Hasta hace pocos años, se pensaba que todos los efectos causados por los estrógenos eran mediados por un solo RE; sin embargo, en 1996 fue descubierto un nuevo receptor que comparte gran homología con el RE conocido, y se decidió denominar entonces 'RE-β' al recientemente descubierto y 'RE-α' al previamente conocido²⁴.

El RE-α es actualmente el más conocido y estudiado. Funcionalmente está organizado en seis dominios, denominados por letras de la "A" a la "F". La región A/B se localiza en el lado amino terminal (Figura 7) de la proteína y es la región menos conservada entre los distintos receptores nucleares. Este dominio contiene una función de activación de la transcripción genética (*Activation Function 1* o *AF-1*) y varios sitios de fosforilación, que tienen un papel relevante en el proceso de activación de la proteína, especialmente en aquellos procesos en los que el receptor es activado en ausencia de hormona^{25,26}.

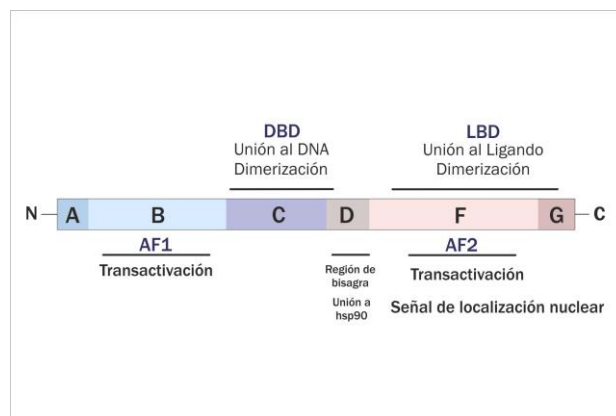
Adyacentemente a la región A/B se encuentra la región de unión al ADN, o dominio C. Esta es la más conservada entre los diferentes receptores nucleares y está compuesta por nueve residuos de cisteínas, que son invariablemente conservados entre los diferentes receptores esteroideos, de los cuales ocho están coordinados alrededor de dos iones de Zn²⁺ para formar dos dedos de zinc que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN. La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos dedos de zinc, conocida como la 'caja P' (*P-box*)²⁷.

Entre la región de unión al ADN y el dominio E/F se encuentra la región D, o región *de bisagra*, la cual no ha sido bien caracterizada aún. Esta participa en la unión con la proteína chaperona de choque térmico hsp90 (*heat shock protein 90*), que permanece unida al receptor mientras este se encuentra en un estado inactivo.

Finalmente, en el extremo carboxiterminal se encuentra la región E/F o dominio *de unión al ligando* (LBD), donde se une la hormona (E2). Esta región, a pesar de que es conservada entre los diferentes receptores esteroideos, es altamente específica para su hormona, es decir que el receptor de estrógeno une estrógeno con alta afinidad, pero no otras hormonas

esteroideas. Otras funciones de este dominio incluyen la activación de la transcripción, o AF-2 (Activation Function 2), la dimerización, la interacción con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción, la fosforilación y la localización nuclear.

Figura 7 *Dominios funcionales del Receptor de Estrógenos*



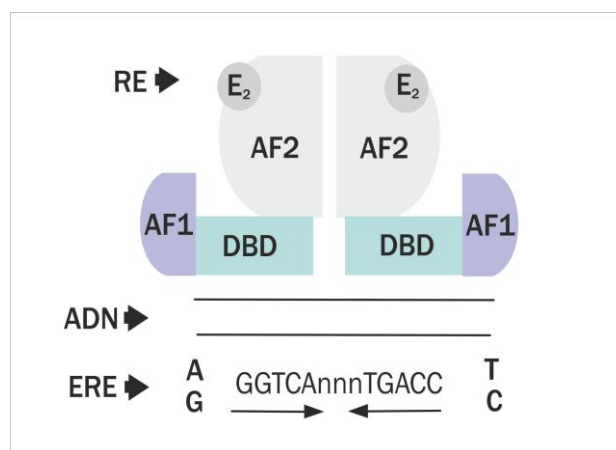
Organización del receptor de estrógeno en dominios funcionales como receptor esteroideo

(Adaptada: Márquez, D. C. 2010)

La teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas establece que el receptor esteroideo es activado al unir el ligando, en este caso el *estradiol 17- β* (E2), y actúa como un factor transcripcional al unirse al ADN estimulando la transcripción de ciertos genes.

De ahí el nombre de *receptores nucleares*, ya que estos ejercen su acción a nivel del núcleo^{28, 29}. Este modo de acción de los esteroides ha sido denominado ‘genómico’³⁰ ya que requiere la activación del receptor al unir su hormona específica después de atravesar la membrana —es decir, la homo o heterodimerización (dos RE- α o un RE- α se heterodimeriza con un RE- β) del complejo hormona-receptor— y el reconocimiento de una secuencia específica en el ADN, o del elemento de respuesta al estrógeno (ERE)³¹ (Figura 8). En consecuencia, el proceso de transcripción es activado tras la formación del complejo de iniciación de la transcripción, que incluye diferentes coactivadores, corepresores y proteínas reguladoras de la transcripción.

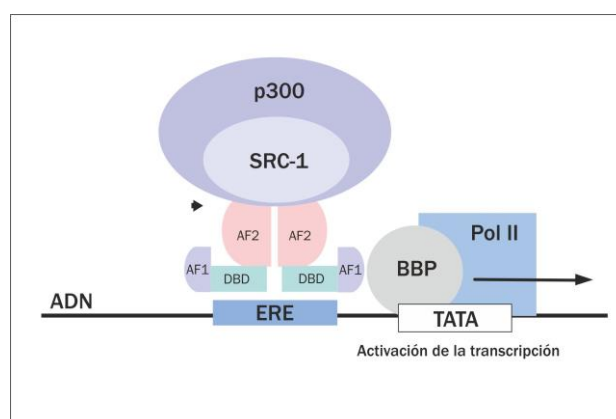
Figura 8 *Homodímero del Receptor de Estrógeno en unión al ADN*



Cuando se une la hormona el RE es activado y se dimeriza antes de unirse al ADN en la región específica o ERE (Elemento de respuesta a Estrógeno) (Adaptada: Márquez, D. C. 2010)

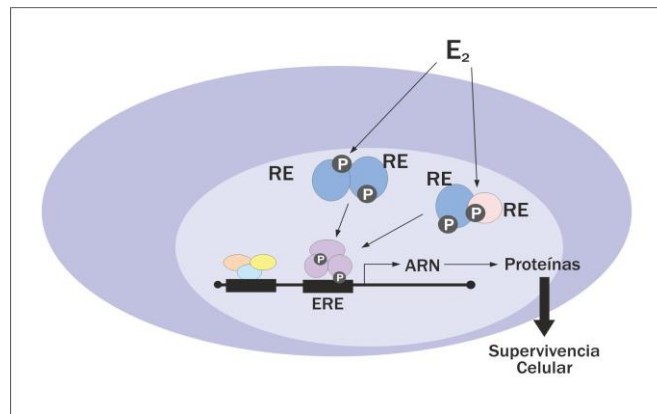
La transcripción estimulada por el RE es finamente regulada, dependiendo del tejido donde ocurre. Este control tan específico parece depender de la composición del complejo de iniciación de la transcripción (Figura 9)³². Un grupo de factores transcripcionales basales interactúa con el complejo hormona-receptor para formar un complejo de preiniciación, al cual se le unen luego una serie de proteínas co-reguladoras llamadas ‘proteínas de interacción con receptores’ o ‘RIPs’ (*Receptor Interacting Proteins*). Estos co-reguladores pueden activar —co-activadoras— o reprimir—co-represoras— la transcripción. En este proceso se induce la síntesis de ARN, que finalmente da como resultado la producción de nuevas proteínas en el modelo genómico (Figura 10).

Figura 9 *Complejo de iniciación de la transcripción*



RE dimerizado se une a las proteínas co-activadoras SRC-1 y CBP-300 para formar junto con otras proteínas el complejo de iniciación de la transcripción que da paso a la síntesis del ARN. (Adaptada: Márquez, D. C. 2010)

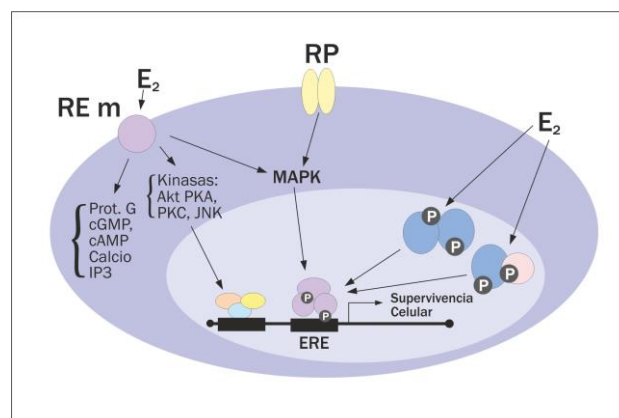
Figura 10 Efectos genómicos del Receptor de Estrógenos.



Activación del RE-alfa o RE-beta al unir el ligando Estradiol 17 beta (Estradiol), fosforilación, unión al ERE y activación de la transcripción con la consecuente estimulación de la síntesis de genes que promueven la supervivencia celular. (Adaptada: Márquez, D. C. 2010)

El modo de acción “no-genómico” del estrógeno —y, en general, de todas las hormonas esteroideas— es un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos, y que no requiere de los procesos de transcripción y de síntesis de nuevas proteínas para poder producir su efecto primario. Por esta razón, este debe ser mediado por un receptor que se localiza en la membrana. Entre los efectos rápidos, se destacan los flujos de iones (descrito anteriormente), el desencadenamiento de potenciales de acción y la descarga de vesículas secretoras, o activación de proteínas kinasas asociadas a la membrana; todos estos ocurren en unos pocos segundos o minutos (Figura 11)³³.

Figura 11 Efectos “No genómicos” del Receptor de Estrógenos de Membrana.



El Estradiol 17 beta (E2) se une a receptores de membrana (REm) y activa diferentes cascadas de señales que pueden directa o por comunicación cruzada estimular la activación de mecanismos genómicos. Entre los efectos mediados por el receptor de membrana están la activación de canales de calcio, proteínas G, interacción con receptores de péptidos (RP), activación de kinasas, etc. (Adaptada: Márquez, D. C. 2010)

✓ ***Secreciones vaginales como mecanismo protector***

La secreción vaginal con líquido de humidificación, que en ausencia de excitación tiene una elevada concentración de H⁺ (pH de 3,5 a 4,5) a lo largo del ciclo, así como el moco cervical que, a su vez, contiene propiedades antibacterianas —ya sea por su viscosidad, por el contenido celular (leucocitos) o por las globulinas— y el epitelio activo representan una estructura dinámica fisiológica que interactúa con los microorganismos para prevenir infecciones⁸.

Una capa de moco compuesto de proteínas glicosiladas (mucinas), semejante a un gel espeso, constituye una trampa y protege a las células epiteliales vaginales y uterinas del contacto directo con los agentes patógenos. Se ha demostrado que las mucinas se adhieren directamente a los microorganismos, incluyendo *Candida albicans*, a través de glicanos³⁴. Intercalada con los complejos de mucina, hay una fase acuosa que contiene inmunoglobulinas y antimicrobianos que, a su vez, actúan sobre los patógenos viables y complementan la acción defensiva³⁵.

Además, se encuentra específicamente el moco cérvico-vaginal secretado por las criptas cervicales, que representa una barrera importante para proteger la parte superior del tracto reproductivo femenino de infecciones de transmisión sexual ascendentes. Un componente importante de este moco, que afecta a la transmisión de organismos patógenos, es el pH. Normalmente, el moco cervicovaginal se acidifica hasta alcanzar un pH aproximado de 5³⁶.

Se ha demostrado que el entorno del moco ácido de la vagina retrasa la velocidad de difusión del VIH mediante la supresión de la carga superficial negativa del virus, contrarrestando así el efecto del semen, que tiene un pH cercano a 8; de ese modo, el VIH mantiene su carga superficial negativa favoreciendo una mayor tasa de difusión³⁷.

✓ ***Integridad y funcionalidad de los epitelios, inmunidad.***

El revestimiento del tracto reproductivo femenino, compuesto por células epiteliales y mucosas, proporciona una barrera física robusta e inmunológica activa que evita la transmisión de las infecciones adquiridas.

Como barrera natural, la mucosa vaginal con su microbiota normal compite contra los gérmenes patógenos por el sitio y por los nutrientes; el mucus, compuesto por mucinas, oligosacáridos y enzimas proteolíticas, tiene la capacidad de atrapar microorganismos, ya que la permeabilidad selectiva permite excluir toxinas y patógenos. Por último, las cilias, a través de su movimiento, propulsan la eliminación de gérmenes hacia el exterior³⁸.

Cuando nos referimos a los epitelios, incluimos el cilíndrico del canal cervical, el pluriestratificado vaginal, el estratificado y queratinizado que cubre toda el área vulvar. La integridad de estos permite cumplir las múltiples funciones del epitelio: revestir y cubrir las superficies, sintetizar y secretar sustancias complejas a partir de moléculas simples, ejercer protección mecánica, absorber, transportar y excretar sustancias, facilitar el deslizamiento entre superficies internas y actuar como receptor de estímulos sensoriales⁴.

La parte baja del tracto reproductivo femenino, que consiste en la vagina y el ectocérvix, está revestida con múltiples capas, de las cuales la exterior protege eficazmente el tejido subyacente de abrasiones durante el coito. La falta de uniones estrechas en las capas epiteliales escamosas permite el movimiento de moléculas pequeñas dentro de los espacios entre las células. Esto puede conducir al transporte intraepitelial de patógenos, tales como el VIH, que a su vez conduce a contacto de patógenos potenciales con células dianas, incluyendo las células de Langerhans y células CD4 + T, que se encuentran dispersas por todo el epitelio vaginal basal³⁹.

Es así como las células epiteliales polarizadas funcionan como la primera línea de defensa contra los patógenos potenciales en el tracto reproductivo femenino.

Inmunidad

Como otras cavidades colonizadas, la defensa humoral y celular es fundamental en la mantención del equilibrio entre los microorganismos y el huésped.

➤ ***Inmunidad temprana e innata***

La inmunidad cuenta con mecanismos inespecíficos (inmunidad temprana e innata) constituidos por las barreras naturales; a nivel del tracto genital inferior, este papel lo desempeña la inmunidad del epitelio. Las rupturas fisiológicas en él (zona de

transformación; orificios glandulares) o los micro traumatismos facilitan la infección y desencadenan la respuesta inmune temprana que reconoce patrones moleculares conservados comunes a distintos grupos o familias de microorganismos patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns, PAMP*) y los destruye sin que haya existido un contacto previo con ellos. Estos PAMP son reconocidos por receptores que se encuentran ampliamente distribuidos en las células fagocíticas³⁸. Las células fagocíticas (macrófagos y polimorfonucleares) se acercan al sitio de agresión atravesando paredes vasculares en respuesta a sustancias quimiotácticas. La célula fagocítica invagina su membrana hasta rodear el microorganismo en una vacuola llamada ‘fagosoma’. Este luego se fusiona en el citoplasma con lisosomas y constituye fagolisosoma, y entonces se produce la lisis del microorganismo^{38, 40}.

Si la fagocitosis es evadida, existen factores auxiliares solubles (anticuerpos IgM, IgG, así como la fracción C3b del sistema complemento) que se unen a la superficie de los microorganismo evasores y advierten a los fagocitos la presencia de un elemento extraño (opsonización). Además, los macrófagos secretan diversas citocinas y quimiocinas que actúan en la respuesta inflamatoria —IL 1-6 y TNF α en la respuesta adaptativa; IL 12 e IL 18 en el reclutamiento leucocitario en el tejido inflamatorio; IL 8 en la proliferación y diferenciación de los glóbulos blancos⁴¹.

Los interferones participan en la interferencia viral por inducción de un estado antiviral en sus células blancas, intervienen en la regulación del crecimiento de células normales y tumorales y regulan la respuesta inmunitaria. La infección viral es uno de los principales estímulos para la producción de interferón alfa por los leucocitos, beta por los fibroblastos y gamma por los linfocitos T activados por antígenos específicos⁴².

Las células *natural killer* (NK) reconocen y destruyen células infectadas y tumorales mediante el mecanismo de citotoxicidad, que consiste en el reconocimiento de la célula blanco a través de sus receptores (glicoproteínas de alto peso molecular) y en la liberación de granzimas y perforinas. Las perforinas generan poros en la célula blanco para que penetren las granzimas (proteasas), y estas conducen a la apoptosis (muerte celular programada)^{41, 43}.

Similares a las células NK de sangre, células NK uterinas producen citoquinas pro-inflamatorias, tales como GM-CSF, IL-10, IL 8-y IFN, y promueven así la respuesta inflamatoria, inducen activación de los macrófagos y generan células T citotóxicas. Alteraciones en la función de las células NK en la defensa innata del tracto reproductivo femenino se relacionan con mayor susceptibilidad a los virus del herpes⁴⁴.

➤ ***Inmunidad tardía***

Los mecanismos específicos de la inmunidad (tardía) son ejercidos por los linfocitos T (inmunidad celular) y por los linfocitos B a través de los anticuerpos (inmunidad humoral). Ambas respuestas son capaces de responder a diferentes antígenos (especificidad) mediante la presencia de receptores en la membrana con alta afinidad (TCR, *T cell receptor* para los linfocitos T y las inmunoglobulinas para los linfocitos B). Los linfocitos T poseen en la membrana un complejo asociado CD3; además de este tipo de mecanismo, tiene la capacidad de generar memoria inmunitaria. Las células presentadoras de antígenos de la piel son las células de Langerhans, que tienen dendritas, aunque su función no es fagocitar: endocitan el antígeno, lo procesan y luego lo presentan al linfocito T CD4 en el ganglio linfático. Esta presentación activa a los linfocitos T y, luego de 4 a 5 días de expansión clonal, se diferencian en células efectoras y de memoria⁴².

Son consideradas efectoras las siguientes células: a) Linfocitos *helpers* con el marcador CD4, encargados de secretar interleuquinas, y capaces de iniciar y mantener la respuesta inmune (los LT CD4 Th1 activan macrófagos y destruyen patógenos extracelulares y los LT CD4 Th2 colaboran con los linfocitos B para la respuesta humoral); b) Linfocitos citotóxicos, que destruyen con el marcador CD8 las células tumorales o infectadas por virus y c) Linfocitos supresores, que intervienen en mecanismos de supresión de la respuesta inmune^{45, 46}. Las infecciones genitourinarias inducen un aumento significativo de IL-1b e IL-8 en las secreciones vaginales. Basso y col. demostraron que ambas citoquinas son útiles como marcadores evolutivos de la infección así como en la evaluación del éxito terapéutico⁴⁶.

Los linfocitos intraepiteliales, predominantes en el tracto genital inferior, son los linfocitos T CD8+, y la zona de transformación del endocérvix contiene el mayor número de macrófagos, células T (CD4+ y CD8+) y neutrófilos⁴⁷.

Los anticuerpos (IgM, IgG, IgA), que se producen por linfocitos B locales, son secretados en el tejido y luego son transferidos en parte al fluido de la mucosa. Los anticuerpos ayudan a la adhesión en bloque de los microorganismos al epitelio (IgA secretoria), y neutralizan y eliminan microbios y toxinas en el lumen. En el moco cervical humano hay mayores niveles de IgG que de IgA, y esta determina la defensa humoral específica de la superficie de la mucosa en el cérvix^{48,49}.

➤ ***Péptidos antimicrobianos***

En respuesta a estímulos los microbianos, las células epiteliales y los fagocitos secretan péptidos/proteínas solubles (*antimicrobial peptides/proteins* (AMPs), que ayudan a eliminar los agentes patógenos y a mejorar tanto la inmunidad temprana como la tardía⁵⁰; algunos de ellos son constantemente segregados y proporcionan una capa protectora sobre la superficie del epitelio⁵¹. En la secreción cervico-vaginal se pudo detectar la presencia de estos AMPs, tales como las defensinas, la catelicidina, la lactoferrina, la lisozima, la calprotectina, y el elafin inhibidor de leucoproteasa secretora (SLPI)⁵¹, y se ha insinuado que la producción defectuosa de estos péptidos puede predisponer el tracto genital a infecciones⁵⁰. Estos AMPs, por sus propiedades antipáticas y catiónicas, actúan destruyendo las membranas de los patógenos microbianos en la superficie de la célula epitelial⁵². Otros mecanismos complementarios, tales como la hidrólisis de peptidoglicano por la lisozima o la captura del hierro por la lactoferrina, complementan el arsenal antimicrobiano del huésped. SLPI, que muestra actividad antimicrobiana contra las bacterias, virus y hongos, se produce constitutivamente por las células epiteliales del cuello uterino y es muy importante en la secreción cervical^{50, 51}. Este es también un inhibidor de serina proteasa y, por lo tanto, ayuda a controlar los daños causados por la inflamación. El efecto anti-inflamatorio de SLPI no solo se atribuye a las actividades antibacterianas y anti-proteasas, sino también al hecho de que puede suprimir un factor de transcripción central de la respuesta inflamatoria (NFkB)⁵³. Las altas concentraciones de SLPI en el fluido vaginal se asocian con menores tasas perinatales de transmisión del VIH-1, y pueden contribuir a la defensa natural antirretroviral⁵⁴. Las concentraciones de SLPI en el tejido cervical y en el tapón de moco cervical se incrementan significativamente durante el embarazo y después del parto⁵⁵; por otro lado, bajos niveles de SLPI en las secreciones vaginales se han asociado con la presencia de infecciones tracto genital^{50, 56}.

Los péptidos antimicrobianos presentes en el tracto reproductor femenino son eficaces en la inhibición de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (por ej. *S. aureus*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*), de hongos (por ej., *C. albicans*) y de los virus de envoltura (por ej., VIH-1)⁵⁷. De hecho, algunos antimicrobianos endógenos son de amplio espectro antimicrobiano porque pueden inhibir infecciones bacterianas, fúngicas y virales. Por ejemplo, el inhibidor de la secreción de proteasa de leucocitos (SLPI) se ha demostrado que inhibe *S. aureus*, *C. albicans* y el VIH-1^{58, 59}.

➤ ***Factores asociados a la membrana; colaboradores de la respuesta innata***

Durante las últimas décadas, ha habido un rápido progreso en la comprensión de los procesos de reconocimiento de parte del sistema inmune innato, de los componentes microbianos y de su papel fundamental en la defensa del huésped contra las infecciones. El descubrimiento de la familia de receptores reconocedores de patrones tipo Toll (*Toll-like receptors*, *TLR*), en la década del año 1990, demostró que el reconocimiento de patógenos por parte del sistema inmune innato tiene especificidad, y se apoyó en la línea germinal codificada para el patrón de reconocimiento de receptores (*Pattern-recognition receptors*, *PRR*)⁶⁰.

Estos PRR se han desarrollado para registrar específicamente ligandos de macromoléculas microbianas y unirse a ellos. Los ligandos conservados en las distintas especies bacterianas son conocidos como ‘patrones moleculares asociados a patógenos’ (*Pathogen-associated molecular patterns*, *PAMP*)⁶⁰. Los receptores (PRRs) pueden ser solubles, y están localizados en la membrana celular, o bien intracelularmente; hay diferentes tipos de receptores PRRs específicos para las distintas estructuras de PAMPs, y se han encontrado en diversos tipos de células, tales como macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células dendríticas, y células epiteliales del tracto reproductivo femenino^{61, 62}.

Al unirse a sus ligando (PAMPs), los PRRs —por ejemplo, los *Tolllike* receptores (TLRs)— inducen una respuesta aguda y rápida mediante la activación de rutas de señalización complejas que culminan en la inducción de un estado de inflamación, mediado por varias citoquinas y quimioquinas, que facilita la erradicación del patógeno^{61, 62, 63}.

✓ ***Participación de las Hormonas gonadales sobre la Inmunidad: interacción inmuno-endocrina en el control de mecanismo de defensa del epitelio vaginal***

La respuesta inmunológica, como respuesta homeostática bajo control fisiológico, contribuye al mantenimiento de la integridad de las células corporales y de los tejidos. Estas funciones se llevan a cabo no solo a través de las moléculas específicas del sistema, sino también de las hormonas que están presentes en el microambiente de las células inmunológicas, y que pueden restringir su autonomía, probablemente mediante su acción sobre los receptores específicos^{50,64}.

La comunicación inmunoendocrina eficiente implica, entonces, la existencia de vías aferentes y eferentes que constituyen un sistema complejo de retroalimentación. Las hormonas esteroideas participan en la regulación de la respuesta inmune, a la cual le imprimen un dimorfismo sexual, tanto en la humoral como la celular. Si bien los esteroides sexuales son reguladores negativos del timo, los andrógenos y estrógenos afectan diferentes tipos de células inmunes. Los estrógenos estimulan los linfocitos T cooperadores, reducen los supresores, y activarían la diferenciación de células T autorreactivas en el hígado⁶⁵.

En las mucosas del aparato genital, las hormonas gonadales tienen influencia sobre el sistema inmune innato, que consiste en la respuesta temprana que se inicia contra microorganismos y virus, y que posteriormente desencadena el sistema inmune adquirido. Recientes investigaciones han puesto en evidencia que los epitelios del aparato genital, digestivo y respiratorio, secretan a la luz numerosas moléculas que participan en el sistema inmune innato para la defensa de la homeostasis de la mucosa, algunas de las cuales son comunes con el sistema inmune y otras son exclusivas de los epitelios. En el tracto genital, esta actividad recibe el control de las hormonas sexuales, lo que le otorga particularidades que las diferencian de epitelios no dependientes de hormonas. Entre esas moléculas antimicrobianas, se incluyen las siguientes: defensinas, catelicidinas, lactoferrinas, lisosimas, y proteínas surfactantes; citoquinas (mediadores proteicos de las células T, como TNF- α , INF- γ , TGF- β) y chemoquinas (citoquinas que reclutan células inmunes, como la MIP-3 α), todas vinculadas con la defensa y la inflamación⁶⁶.

Hay muchos interrogantes aún sobre los múltiples niveles de inmunidad pre-existente en la parte superior e inferior del tracto reproductivo femenino. La inmunidad innata y adaptativa en el aparato reproductor femenino humano está influenciada por la etapa del ciclo menstrual y está directamente regulada por las hormonas esteroides sexuales, la progesterona y el estradiol. Además, el efecto de las hormonas sobre la inmunidad está mediado directamente por las células inmunes y epiteliales, e indirectamente por estimulación de la secreción del factor de crecimiento de las células del estroma⁶⁷.

Los cambios hormonales durante el ciclo menstrual regulan el sistema inmune a través del tracto reproductor femenino de una manera que optimiza las condiciones para la migración con éxito de los espermatozoides, la fertilización, la implantación y el embarazo⁶⁸. Ya sea por correlación con la etapa del ciclo menstrual o por la adición de hormonas sexuales esteroideas en cultivo o en los estudios *in vivo*, se ha demostrado que el estradiol y/o la progesterona regulan directa o indirectamente todos los aspectos de la inmunidad innata y adaptativa⁶⁷.

Se sabe que los agentes patógenos sexualmente adquiridos inicialmente pueden infectar la mucosa del tracto reproductivo femenino, y que desde ahí puede ocurrir la diseminación sistémica. La integridad de la barrera epitelial del tracto reproductivo superior está directamente influenciada por la presencia de estradiol, y se ha demostrado *in vitro* una reducción de la misma⁶⁹. Por otra parte, el estroma subyacente también modifica directamente la integridad de la barrera de células epiteliales del útero por la presencia de citoquinas y factores de crecimiento secretados a partir de las células estromales, que también operan bajo control hormonal⁷⁰.

Como primera interacción inmune-endócrina, consideraremos los cambios del moco cervical. Para la protección de las células epiteliales vaginales y uterinas del contacto directo con los agentes patógenos, tal como se presentó anteriormente, se establece una capa de moco que se compone de una familia de proteínas glicosiladas, conocidas como ‘mucinas’, que físicamente constituyen una fase de gel espeso que representa una trampa para patógenos. Codificada por el gen MUC, al menos 13 mucinas están presentes y son expresadas diferencialmente por las células epiteliales, dependiendo tanto de la ubicación como del estado menstrual^{71, 72}.

Secretado por las criptas cervicales, el moco cérvico-vaginal humano es el más estudiado en el tracto reproductor femenino y constituye una barrera importante debido a que protege la parte superior del tracto reproductivo femenino de infecciones de transmisión sexual ascendentes. Dos tipos de moco cérvico-vaginal están presentes según la etapa del ciclo menstrual: el moco estrogénico y el progestacional. El primero es fino y acuoso, con una baja viscosidad que permite el movimiento de los espermatozoides; está presente en la fase proliferativa y va aumentando en la ovulación. Este está subdividido en tres tipos en función de su patrón de cristalización⁷³: S, L y P. El moco progestacional es espeso, pegajoso, bloquea el paso de los espermatozoides y está presente en altas concentraciones después de la ovulación, durante la fase secretora, aunque también está presente en niveles bajos durante la fase proliferativa temprana⁷³.

Una característica importante de moco cérvico-vaginal que afecta a la transmisión de organismos patógenos es el pH. Normalmente, el moco cérvico-vaginal se acidifica a un pH de 4-5 y retrasa la velocidad de difusión de agentes patógenos como el VIH^{36,37}.

Cuando nos referimos a las células inmunes naturales, presentamos a los macrófagos y a las células dendríticas, que fagocitan y posteriormente matan a los agentes patógenos a través de la digestión ácida y enzimática. Los macrófagos representan aproximadamente el 10% de los leucocitos presentes en el tracto reproductivo femenino, y predominan en el estroma del endometrio y del miometrio⁷¹. El movimiento de los macrófagos en el tejido endometrial también está regulado por el estradiol y la progesterona, y el número de macrófagos en el endometrio es mayor antes de la menstruación⁷⁴. En contraste con lo antes dicho, el número de macrófagos tisulares vaginales permanece estable durante todo el ciclo menstrual⁷⁴. El fenotipo de los macrófagos vaginales es distinto del de los gastrointestinales; por ejemplo, los macrófagos vaginales expresan mayores niveles de los receptores de CD4 de VIH-1 que los macrófagos intestinales⁷⁵. Este fenotipo único se correlaciona con una mayor susceptibilidad a la infección por VIH-1 de los macrófagos intestinales⁷⁵.

Las células dendríticas, localizadas en el estroma sub-epitelial del endometrio, y las vaginales presentes dentro de la capa epitelial también sufren modificaciones según el estado hormonal⁷⁶. Como células profesionales presentadoras de antígenos son importantes para la respuesta inmune adaptativa durante la infección pero estudios

recientes han implicado a estas células como facilitadoras de la transmisión de VIH y cierta relación hormonal con el proceso. Existe un efecto estimulador del estradiol sobre la expresión de *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin* (DC-SIGN) en la célula dendrítica que podría aumentar la susceptibilidad de las mujeres a la adquisición de VIH-1 por una mejora de la absorción y difusión del virus. El impacto de las hormonas esteroides sexuales endógeno y exógeno en el riesgo de VIH-1 de transmisión de la mucosa en las mujeres aún no se ha determinado completamente⁶⁷.

El número de células NK en el endometrio varía a través del ciclo menstrual, alcanzando un máximo de aproximadamente el 70% de la población total de leucocitos en la fase secretora⁶⁷. Sin embargo, los números de células NK en otras regiones del tracto reproductivo femenino no se ven afectadas durante el ciclo menstrual y representan entre el 10% y el 30% de leucocitos en estos lugares. En general, el menor número de células NK se encuentra en las trompas de Falopio. Los mecanismos que controlan su localización específica en el tracto reproductor femenino son desconocidos y pueden reflejar las variadas responsabilidades funcionales entre los diferentes tejidos de este⁶⁷.

Los neutrófilos están presentes en todo el tracto reproductor femenino, aunque su número es mayor en las trompas de Falopio y disminuyen progresivamente desde la parte superior hacia la vagina⁶⁷. Sus concentraciones son relativamente constantes en todo el ciclo menstrual. Sin embargo, en el endometrio se reconoce un aumento significativo de los neutrófilos en las menstruaciones, precedido por un aumento de la IL-8. La presencia de neutrófilos puede servir a dos propósitos en la menstruación: en primer lugar, para ayudar en la ruptura del tejido endometrial a través de la liberación de elastasa, que posteriormente se activa en metaloproteinasas de matriz; y en segundo lugar, para aumentar la defensa inmune innata ante la interrupción de la barrera epitelial. Los neutrófilos expresan receptores TLRs 1-9 y responden a los agentes patógenos a través de la fagocitosis, la producción de compuestos oxidantes y la liberación de péptidos antimicrobianos. Es de destacar que los neutrófilos producen inhibidores de la proteasa (Trappin-2/Elafin), α -defensinas conocidas como 'péptidos de neutrófilos humanos' (HNPs), fosfolipasas y citoquinas⁷⁷.

Al igual que la mayoría de las funciones inmunes en el tracto reproductor femenino, la concentración relativa de los péptidos antimicrobianos también está mediada por fluctuaciones hormonales durante el ciclo menstrual. En la mitad del ciclo (día 13), después de la estimulación de estradiol se detectó una supresión de SLPI, HBD2, HNP1-3, y lactoferrina en líquidos de lavado cérvico-vaginales que se mantiene de 7 a 10 días⁷⁸. Se ha demostrado que los fluidos cérvico-vaginales de lavado de mujeres sanas tienen una capacidad intrínseca para inhibir el VIH-1 y HSV-2⁷⁹. La supresión de la producción de péptidos antimicrobianos durante el ciclo menstrual normal puede tener un impacto significativo e incrementar la vulnerabilidad a los patógenos de transmisión sexual, específicamente el VIH.

Los péptidos antimicrobianos de amplio espectro no inhiben la colonización por bacterias comensales normales de protección, y ha sido demostrado que las secreciones de cultivos primarios de células epiteliales uterinas o de las trompas de Falopio inhiben directamente *N. gonorrhoeae*, *C. albicans*, y 1-VIH-^{r57}, y, además, estas mismas secreciones no tuvieron efecto sobre los comensales *Lactobacillus crispatus*, lo que sugiere que tanto las bacterias comensales como los péptidos antimicrobianos han evolucionado para mejorar la protección en la parte inferior del tracto reproductivo femenino⁵⁷.

Tanto las citocinas como las quimiocinas, que representan mensajeros químicos, mantienen el entorno homeostático normal y median en la proliferación endometrial, en la menstruación y en la implantación. La secreción de estas citoquinas puede estar bajo el control directo de estradiol y/o de la progesterona, o indirecto a través de las acciones de las hormonas sexuales en las células del estroma subyacente. Por ejemplo, la retirada de la progesterona del endometrio humano conduce a la sobre regulación de la IL-8, MCP-1 y la COX-2⁸⁰. Una familia de citoquinas importante que participa en la inmunidad del tracto reproductivo femenino, en particular contra los virus, es la de los interferones del tipo I (IFN). Estos consisten en varios subtipos IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN ω y IFN κ en humanos. Aunque el papel del IFN tipo I en la defensa inmune innata está bien definido, la influencia de las hormonas sexuales en la modulación de la respuesta de IFN en los seres humanos es relativamente desconocida⁸¹.

Las células T, que se encuentran tanto en el estroma de la vagina como en el cuello uterino y en el útero, también están bajo la influencia hormonal. Estas se dispersan dentro de las

células epiteliales, donde son conocidas como ‘linfocitos intraepiteliales’. En el tracto reproductor femenino, los linfocitos T CD8 + (35-50%) predominan sobre los linfocitos T CD4 + (25%). Durante la fase proliferativa se desarrollan agregados de linfocitos, que luego van creciendo y son más grandes durante la fase secretora del ciclo menstrual⁸². En mujeres post-menopáusicas, la ausencia de agregados de linfocitos proporciona evidencia adicional de que el estradiol y la progesterona regulan la formación ellos y de su tamaño. Así, queda claro que el desarrollo de agregados de linfocitos sugiere un papel en la supresión de la inmunidad mediada por células, que se produce en el útero durante la fase secretora del ciclo, durante la ovulación, y cuando es más probable que ocurra la implantación⁸³.

En el útero humano, también los niveles del receptor de la célula epitelial, responsable del transporte de IgA, varían con la fase del ciclo menstrual. Usando el modelo de la rata, los estudios han demostrado que la IgA, la IgG y los receptores son elevados en el útero por el estradiol durante el ciclo reproductivo y después del tratamiento con estradiol de ratas ovariectomizadas⁸⁴. En contraste, estos tres se inhiben en la vagina con el tratamiento hormonal⁸⁵. Aunque la secreción de IgA es controlada por hormonas durante el ciclo menstrual, los cambios en la producción local responden más a la estimulación antigénica; las diferencias en la localización, tanto anatómica como del tipo y de la intensidad de los anticuerpos en el tracto reproductivo femenino, sugieren una integración de las respuestas humorales y hormonales mediadas por un antígeno⁸⁵.

Podemos marcar otra interacción inmuno-endócrina, si consideramos que el desarrollo de células T reguladoras —Th1, Th2, Th17— y las respuestas inmunes durante la estimulación de antígenos también pueden estar mediadas directamente por hormonas — los estrógenos aumentan los linfocitos T reguladores— o pueden estarlo indirectamente por medio de citoquinas regulado por hormonas. Los antígenos extraños a la respuesta inmune requieren una coordinación perfecta de las células que participan en sus diferentes fases. El objetivo de la respuesta es la rápida destrucción de los microorganismos con una mínima repercusión en las células y los tejidos propios. Hay dos tipos principales de células coordinadoras: *las células colaboradoras*, que organizan la respuesta inmune inicial y las *células reguladoras*, que evitan el ataque autoinmune y desactivan la respuesta una vez controlada la infección. Las células TH1, TH2 y TH17 tienen funciones colaboradoras y reguladoras. Hay tres tipos de células colaboradoras que coordinan

respuestas a parásitos intracelulares (TH1), helmintos (TH2) y bacterias y hongos extracelulares (TH17)⁸⁶. Las células T reguladoras desempeñan un papel importante en la coordinación de los primeros momentos de la respuesta a la infección viral de forma directa e indirecta, induciendo la diferenciación de las células TH17. Las células TH17 están asociados con el reclutamiento de neutrófilos en el tracto reproductivo femenino y resultan fundamentales para la eliminación de *N. gonorrhoeae* durante una infección⁸⁷. Pero también debemos considerar que en presencia de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-6, las células T reguladoras se diferencian en un subconjunto distinto TH17, que además de estar implicado en la inflamación, la hiperfunción de esas células TH17 se asocia con enfermedades como la artritis reumatoidea, respondiendo a la hipersecreción de la citoquina proinflamatoria IL17.^{88,89}

Finalmente, para conferir protección en tiempos en que el sistema inmune está reprimido por las hormonas sexuales para favorecer la procreación, las células epiteliales y las células inmunes generan receptores TLRs, que confieren protección a través de la producción de citoquinas y quemoquinas; estas, a su vez, reclutan y activan células inmunes. En un estudio reciente se ha demostrado que tanto el estrógeno como la progesterona controlan negativamente a los TLRs, pero sin embargo no impiden su regulación por parte de componentes bacterianos⁶⁹.

Todas estas evidencias indican el rol regulatorio clave de las hormonas en el sistema inmune, y llevan a considerar a las células epiteliales como centinelas de la inmunidad del tracto genital femenino en la interfase entre los sistemas inmune y endocrino. Es de destacarse también que en el tracto genital femenino el sistema inmune es más especializado que en el masculino, ya que a la vez que lo protege de patógenos potenciales, le provee un ambiente receptivo para el espermatozoides alogeno y para el embrión.

Microbiota vaginal

La mayoría de los estudios dependientes o independientes del cultivo dan la impresión de que la microbiota vaginal es estática, porque la mayoría de ellos se llevan a cabo como una "instantánea" en el tiempo y no tienen en cuenta que las comunidades microbianas vaginales experimentan cambios en su representación a lo largo el tiempo, y además se ven afectadas por muchos factores. Los lactobacilos han sido descritos consistentemente como

los microorganismos dominantes de dicho hábitat, y es por ello que se considera que tienen un papel importante en el mantenimiento del ecosistema vaginal. Dichos gérmenes previenen la excesiva proliferación de otros microorganismos que, de convertirse en dominantes, podrían inducir alteraciones, como estados de vaginosis, vaginitis y cervicitis que, a su vez, podrían complicarse con afectación de estructuras regionales ascendentes, como el útero y las glándulas de Bartolino o incluso convertirse en una infección sistémica^{90, 91, 92}.

La mayoría de los microorganismos que se detectan con regularidad en la vagina de mujeres sanas son típicos del hábitat intestinal, lo que sugiere que el tracto entérico podría actuar como reservorio de dichos agentes infecciosos. Sin embargo, las frecuencias relativas son muy distintas a las encontradas en la porción final del tubo digestivo. Las diferencias más notables son las siguientes: los lactobacilos son dominantes en la vagina —hasta el punto de ser prácticamente exclusivos en muchos casos—, mientras que son minoritarios en el intestino, donde no siempre aparecen, y cuando lo hacen su proporción nunca es mayor del 1%⁹³. En general, el porcentaje de muestras de exudado vaginal en mujeres normales que presentan predominio de lactobacilos es superior al 60%, tanto si la detección de los mismos se realiza mediante cultivo⁹⁴, como si se hace por métodos genotípicos⁹⁵. Por otro lado, las bacterias grampositivas o gramnegativas anaerobias — estrictas de los grupos *Clostridium-Eubacterium* y *Bacteroides-Prevotella* respectivamente—, que dominan el hábitat intestinal, aparecen esporádicamente en la vagina, lo que sugiere que en esta mucosa son transitorios más que colonizadoras⁹⁵. En la Tabla 1 se presentan los géneros de microorganismos cultivables que se encuentran en la vagina de mujeres sanas.

Tabla 1 Géneros de microorganismos que se encuentran en la vagina de mujeres sanas

Cocos y bacilos Gram positivos. Anaerobios- aerotolerantes	<i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>
Cocos y bacilos Gram positivos. Anaerobios facultativos	<i>Corynebacterium</i> <i>Gardnerella</i> <i>Staphylococcus</i> (fundamentalmente <i>S. epidermidis</i>)

Bacilos Gram negativo. Anaerobios facultativos.	<i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i>
Micoplasmas	<i>Mycoplasma: M. hominis</i> <i>Ureaplasma</i>
Bacilos y cocos Gram positivos. Anaerobios estrictos	<i>Atopobium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Propionibacterium</i>
Bacilos gramnegativos Anaerobios estrictos	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i>

Identificación de lactobacilos

A los lactobacilos se los incluye en el grupo amplio y heterogéneo de las bacterias del ácido láctico; son integrantes de la familia *Lactobacillaceae* y comprenden 256 especies incluyendo las subespecies (<https://www.dsmz.de/de/bakterielle-diversitaet/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>), caracterizadas por ser Gram positivas, no esporuladas y con un catabolismo de los azúcares estrictamente fermentativo, cuyo producto final predominante es dicho ácido orgánico. En general, son bacterias anaerobias facultativas y acidofílicas, ya que pueden tolerar las elevadas concentraciones de ácido que originan como producto de su metabolismo fermentativo. De este modo, al disminuir el pH de los sustratos donde se desarrollan, inhiben la proliferación de un gran número de microorganismos. Además presentan genomas pequeños, por lo que son muy exigentes nutricionalmente. Sin duda, su inocuidad como agentes infecciosos se debe también en parte a esta escasez de información genética; inclusive en muchas cepas aún no se han descrito genes codificantes de factores de virulencia⁹⁶.

En 1892, el Profesor Albert Döderlein (1860-1941) publicó su monografía definitiva, en la que registró que los organismos cultivados de origen vaginal eran una fuente de ácido láctico, que podían inhibir el crecimiento de patógenos *in vitro* e *in vivo*⁹⁷. Por su parte, en 1928 Stanley Thomas identificó el bacilo Doderlein como *Lactobacillus acidophilus*, añadiendo, proféticamente, que se trataba de un grupo característico de las especies relacionadas, o bien, de una especie que se sometió a una transformación notable⁹⁸. En 1980, de acuerdo con la observación de Thomas, se demostró que el grupo conocido como *L. acidophilus* era muy heterogéneo⁹⁹, y que las especies obligatoriamente homofermentativas incluidas en el complejo *Lactobacillus acidophilus* eran las siguientes:

- ✓ *Lactobacillus acidophilus*
- ✓ *Lactobacillus amylolyticus*
- ✓ *Lactobacillus amylovorus*
- ✓ *Lactobacillus crispatus*
- ✓ *Lactobacillus gallinarium*
- ✓ *Lactobacillus gasseri*
- ✓ *Lactobacillus iners*
- ✓ *Lactobacillus jensenii*
- ✓ *Lactobacillus johnsoni*

Debido a la heterogeneidad, el grupo fue subdividido en grupos de ADN homólogos que no se podían distinguir bioquímicamente¹⁰⁰, formando un número de especies diferentes dentro del complejo *L. acidophilus*^{101, 102}. Las especies estrechamente relacionadas dentro de este complejo son difíciles de diferenciar por métodos fenotípicos, y podrían explicar la variación en las especies de lactobacilos descripta en diferentes estudios^{103, 104}.

En los métodos dependientes de cultivo se incluyen habitualmente dentro del género *Lactobacillus*, a bacilos no esporulados, gram positivos y catalasa negativos. Adicionalmente, puede emplearse como criterio el desarrollo en medio MRS, aunque esta última exigencia podría dejar fuera a algunas especies como *L. iners*. Teniendo en cuenta que en los aislamientos primarios los lactobacilos se comportan como organismos fastidiosos, es aconsejable la incubación en medios enriquecidos con hemo (hemina), hemoglobina o sangre así como la atmósfera enriquecida en CO₂, o incluso anaerobia¹⁰⁵.

Una vez purificados, los aislados se suelen someter a las pruebas de identificación fenotípica, que tradicionalmente consisten en la determinación de la capacidad de la cepa en estudio para fermentar diferentes fuentes de carbono así como la capacidad de crecer en medios con concentraciones crecientes de sal¹⁰⁶. Tanto unas pruebas como las otras indicaron que la vagina está colonizada preferentemente por dos grupos: *L. acidophilus* y/o *L. fermentum*¹⁰⁷. Sin embargo, cuando se aplicaron métodos genotípicos de identificación a los mismos aislados, las especies predominantes fueron *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii*, tanto si se analizaba el grado de homología de los ADN cromosómicos¹⁰⁸, como si se determinaba la huella genética (*DNA fingerprinting*)⁹⁵ o la secuencia del ARNr 16S. Por estos métodos también se detecta con frecuencia en la vagina *L. iners*¹⁰⁹.

L. iners es considerada actualmente una especie de lactobacilo que merece un análisis exhaustivo, ya que prácticamente no se ha detectado mediante técnicas de cultivo, debido a su exigencia nutricional y a su incapacidad de desarrollar en medios ácidos, como MRS, descritos para lactobacilos. Ferris et al. detectaron clones de ADN de *L. iners* relacionados con los cambios en la microbiota vaginal, después del tratamiento de la vaginosis bacteriana con metronidazol, Asimismo, Jakobsson et al. refirieron modificaciones en la microbiota vaginal durante el tratamiento de fertilización con estrógenos¹⁰⁵. Utilizando métodos genotípicos, ambos autores describieron que *L. iners* resulta dominante cuando la microbiota se encuentra en una etapa de transición entre anormal y normal, ya sea debido a un tratamiento o a cambios fisiológicos bajo terapia con estrógeno¹¹⁰.

Utilizando técnicas de base molecular se han podido identificar más de 120 especies de *Lactobacillus*, y se han detectado más de 20 especies en la vagina. Sin embargo, se conoce que la microbiota vaginal saludable no contiene un gran número de especies diferentes de *Lactobacillus*. Más bien, una o dos especies de lactobacilos a partir de una gama de tres o cuatro especies (principalmente *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* y *L. gasseri*), que son las dominantes, mientras que otras especies son raras y tienden a ser nuevos filotipos¹¹¹.

El valor numérico (VN) o Nugent surge del recuento, con alta precisión y reproductibilidad, de morfotipos bacterianos habituales del contenido vaginal en la coloración de Gram. La proporción relativa de los morfotipos presentes, genera un VN que

va de 0 a 10. La interpretación es la siguiente: de 0 a 3 normal (mayoría de lactobacilos), 4 a 6 microbiota intermedia (disminución de lactobacilos y aumento anormal de otras bacterias habituales) y 7 a 10 Microbiota habitual vaginal francamente alterada, (desaparición práctica de lactobacilos y aumento de microbiota fundamentalmente anaeróbica)¹¹².

El estudio del balance del contenido vaginal (BACOVA) considera el VN junto con la reacción inflamatoria vaginal (RIV). En base a la relación de estos dos criterios se distinguen cinco estados vaginales básicos (EVB). Estos son: I) estado de microbiota normal (MN) y ausencia de reacción inflamatoria vaginal (RIV), II) microbiota normal con RIV (MN+RIV), III) microbiota intermedia sin RIV (MI), IV) vaginosis bacteriana (VB) —alteración de la microbiota sin RIV— y V) vaginitis microbiana inespecífica (VMI) —alteración de la microbiota vaginal con RIV—¹¹³.

En las mujeres sanas con una puntuación normal de Nugent, 202 aislamientos vaginales fueron probados contra 26 tipos y cepas de referencia de *Lactobacillus*¹¹⁴. En 18 de 23 mujeres, la microbiota vaginal fue dominada por una sola especie de *Lactobacillus*, y en cinco de ellas se detectaron dos diferentes especies o dos cepas diferentes de la misma especie de *Lactobacillus*. Por otro lado, las únicas especies detectadas fueron *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, y *L. jensenii*¹¹⁴. En un estudio de seguimiento se pudo ver que solo una mujer fue colonizada por más de dos especies de *Lactobacillus*, cuatro fueron colonizados por dos especies diferentes y 17 fueron colonizados por una sola especie¹¹⁵. Aunque este estudio fue severamente limitado por el pequeño número de colonias examinadas por paciente (10 de agar sangre, 100 de agar Rogosa), la exclusión de otras especies concuerda con la teoría de la "exclusión competitiva"¹¹⁶ y con la capacidad superior de *L. iners* y *L. crispatus* para competir con otras bacterias de recursos vaginales, una estrategia de supervivencia conocida como "la interferencia bacteriana"¹¹⁷. Por otra parte, la rara coexistencia de múltiples especies dominantes de *Lactobacillus* podría deberse a la colonización preventiva por una especie determinada, o bien por influencia de factores referidos al huésped¹¹¹.

Microbiota vaginal sana no dominada por los lactobacilos

Utilizando técnicas independientes del cultivo, varios investigadores han demostrado que una proporción significativa (7-33%) de las mujeres sanas carecen de números apreciables de especies de *Lactobacillus* en la vagina^{109, 118, 119, 120, 121}, que pueden ser sustituidas por otras bacterias productoras de ácido láctico, como *Atopobium vaginae*, especies de *Megasphaera* y *Leptotrichia*¹²¹.

A pesar de que la estructura de las comunidades puede diferir entre las poblaciones, la salud puede mantenerse siempre que la función de estas comunidades, es decir, la producción de ácido láctico, continúe¹⁰⁹. Por lo tanto, podría decirse que la ausencia de lactobacilos o la presencia de ciertos organismos, tales como *Gardnerella vaginalis*, o especies de *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Pseudomonas* y/o *Streptococcus*, no constituye un estado anormal^{119,122}. Este problema todavía no está claro, debido a que los estudios no abordan el hecho de que existe una proporción de mujeres "sanas" que son pacientes en transición hacia o desde VB, o que pueden tener VB asintomática, es decir microbiota anormal pero sin síntomas debido a factores genéticos, inmunológicos, hormonales, etc. De hecho, un estudio molecular reciente confunde aún más el tema, al señalar que *G. vaginalis* puede producir dominancia transitoria en mujeres sanas como consecuencia de perturbaciones, tales como aumento en el pH durante la menstruación¹²³.

Desbalance de la microbiota: Disfunción Vaginal

El desbalance de la microbiota vaginal puede ocurrir debido a una infección de transmisión sexual, (ETS) como la tricomoniasis, a la colonización por un organismo que no es parte de la comunidad vaginal normal, —como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, o *Listeria monocytogenes*—, o por el aumento o crecimiento excesivo de la virulencia de un organismo, que es una parte constitutiva, por ejemplo *Escherichia coli*, *Candida* spp. Las alteraciones en la microbiota vaginal no implican necesariamente un estado de enfermedad o la aparición de signos y/o síntomas. La enfermedad resulta de la interacción entre la virulencia microbiana, la dominancia numérica, y la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped¹²⁴. El desbalance de la microbiota es uno de los factores que conlleva a un estado de “disfunción vaginal” (DV). El concepto clínico de DV abarca un número elevado de síndromes y se ha demostrado en un estudio previo la dimensión alarmante, dado que un 68% de las mujeres estudiadas en edad fértil y asintomática

mostraron indicadores indubitables de anomalías en el contenido vaginal, reveladores de un claro estado de disfunción de la vagina¹²⁵.

La disfunción vaginal de etiología microbiana expresada en cualquiera de sus síndromes individuales (vaginosis, vaginitis) o en conjunto, es un factor de alto riesgo para la adquisición de infecciones de transmisión sexual, y podría presentar riesgo quirúrgico, así como alteraciones gestacionales e infecciones maternas fetales^{3,4,5}.

Aun hoy la etiología de la Vaginosis Bacteriana y de la Vaginitis Microbiana Inespecífica son un misterio. De hecho, la etiología microbiana se encuentra en discusión y amerita mayor investigación, ya que representa en forma empírica la clave en la decisión de los tratamientos. Asimismo, se deben considerar los factores sistémicos, fundamentalmente del sistema hormono-inmunológico, de manera que es significativo considerar que puede obedecer a cambios sistémicos y/o a factores externos, tales como actividad sexual, anticoncepción, invasión vaginal por microbiota habitual o exógena como agentes típicos de transmisión sexual y conductas higiénicas, entre los más estudiados^{6,7,8}.

Infecciones del tracto genital inferior

Vaginosis bacteriana

La vaginosis bacteriana (VB) es una condición polimicrobiana, caracterizada por una disminución en la calidad o cantidad de lactobacilos, y en la producción de peróxido de hidrógeno, así como un aumento de mil veces en el número de otros organismos, particularmente de bacterias anaerobias: *Gardnerella vaginalis*, especies de *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, y especies de *Mobiluncus*, en ausencia de RIV. También son comunes especies de *Fusobacterium* y *Atopobium vaginae*^{111, 126}. Se encuadra en VN de 7 a 10 y corresponde al EVB IV (BACOVA). La presencia de células guía determina la suma de dos puntos al VN real obtenido, en los casos de VN comprendidos entre 0 y 6. Este criterio posee valor predictivo positivo y negativo superior al 90%¹¹³.

El pH normal prácticamente descarta este EVB y en la mayoría de los casos es elevado al igual que en MI y VMI. La prueba de aminas posee valor predictivo positivo y negativo superior al 80% en pacientes sintomáticas¹²⁷.

BACOVA, no requiere la determinación del pH y/u olor a aminas para definir el EVB de VB. Existen casos sobre todo en mujeres oligo o asintomáticas en que se detecta morfológicamente un estado de VB, sin alteración de ambos criterios¹²⁷.

Existe otro criterio descripto previamente en 1982, por Amsel y col.¹²⁷ quienes definieron la entidad clínica de VB considerando que debían estar presentes tres o más de los cuatro criterios que se detallan a continuación:

- Presencia de flujo vaginal abundante, fino y homogéneo
- pH > 4,5
- Prueba de aminas (+)
- Presencia de células guía (“clue cells”)

El mecanismo por el cual se produce el desequilibrio de la microbiota y la influencia de algunos factores, como alteraciones hormonales y/o inmunes, la actividad sexual, susceptibilidad genética, duchas vaginales, dispositivos intrauterinos etc. en la patogénesis de la VB, no está claro.

El peróxido de hidrógeno producido por los lactobacilos es importante en la prevención de sobrecrecimiento de los anaerobios, normalmente presentes en la microbiota vaginal. Con la pérdida de lactobacilos, se eleva el pH y ocurre el crecimiento excesivo de anaerobios vaginales. Estos producen grandes cantidades de enzimas proteolíticas, que descomponen los péptidos vaginales en una variedad de aminas que son volátiles, malolientes, y esto se asocia con aumento de la trasudación vaginal y con la exfoliación de células escamosas epiteliales, lo que resulta en las típicas características clínicas observadas en los pacientes con VB. El aumento de pH también facilita la adherencia de *G. vaginalis* a las células epiteliales exfoliantes¹²⁶.

La diferencia en la microbiota vaginal entre las mujeres con y sin VB se puso de manifiesto en un estudio que utilizaron sondas de ADN sobre el contenido vaginal de 27 mujeres con VB y 46 controles^{128,129}. En total, fueron identificados 35 filotipos bacterianos en las mujeres con VB, incluidos 16 que fueron reconocidos recientemente. Las mujeres con VB presentaron una media de 12,6 filotipos (rango de 9 a 17) por muestra, frente a los 3,3 filotipos (rango de 1 a 6) por muestra en las mujeres sin VB. Los organismos recientemente identificados por PCR incluyen bacterias fastidiosas

llamadas "VB bacteria asociada" (BVAB) 1, 2 y 3", en el orden de los Clostridiales, que parecen ser los indicadores específicos de BV^{129,130}.

Algunos datos sugieren que *G. vaginalis* es un protagonista clave en la patogénesis de la VB, y el desarrollo de un biofilm podría ser un componente esencial de este proceso, además del sobrecrecimiento gradual de residentes anaerobias pertenecientes a la microbiota vaginal. Un estudio de la microbiota en las superficies de las células epiteliales vaginales de muestras de biopsia de mujeres con VB mostraron un biofilm adherido a todo o parte del epitelio; *Gardnerella vaginalis* representaba el 90% de las bacterias en la biopelícula y *Atopobium vaginae*, la mayor parte del resto¹³¹. La descamación posterior de estas células epiteliales se traduciría en las células guías clásicas del diagnóstico de este síndrome. A diferencia de lo hallado en VB, no se observaron biopelículas adheridas en el epitelio de la mayoría de los controles sanos, sino acumulaciones estructuradas de bacterias en las secreciones que se unen débilmente a la superficie celular¹³¹.

La actividad sexual es un factor de riesgo para la VB, y la mayoría de los expertos creen que esta entidad no se produce en las mujeres que nunca han tenido relaciones sexuales vaginales^{132,133}. Los estudios epidemiológicos apoyan decididamente la transmisión sexual de patógenos de VB. Hay una alta incidencia de VB así como una concordancia de la microbiota vaginal en mujeres que tienen relaciones sexuales con mujeres, lo que sugiere que la transmisión sexual es importante en este contexto^{134,135}. No está claro, sin embargo, si un tipo de actividad sexual puede ser más importante que otro en la patogénesis de la infección.

Entre las mujeres sexualmente activas, los factores de riesgo adicionales más estudiados para la adquisición de la VB incluyen las parejas sexuales múltiples, las duchas vaginales, los dispositivos intrauterinos medicados con cobre^{134,137,138,139,140}; se ha demostrado asociación con las duchas vaginales únicamente y no con otros comportamientos personales de higiene¹⁴¹.

Aunque es probable un cierto grado de susceptibilidad genética a la VB, se ha establecido que no hay asociación entre un polimorfismo del gen y esta¹⁴². Además, diversos autores han documentado que entre un 50% y 75% de las mujeres con VB son asintomáticas^{132,143}. Las personas con síntomas suelen presentarse con aumento de flujo vaginal asociado a

un característico olor a pescado que puede ser más notable después del coito^{131, 143}. La descarga es de color blanco, delgado y homogéneo.

La VB por sí sola no causa disuria, dispareunia, prurito, ardor, o inflamación vaginal (eritema, edema); generalmente esa clínica se presenta cuando está asociada a otra patología, como cervicitis (secreción endocervical muco-purulenta o sangrado fácilmente inducido), con o sin infección concomitante por clamidia o gonococo¹⁴⁴.

Vaginitis microbiana

○ ***Vaginitis Inespecífica***

La vaginitis microbiana inespecífica (VMI) se define básicamente (acompañada de otros criterios secundarios) por una alteración de la microbiota habitual vaginal (un valor numérico superior a tres) y por la presencia simultánea de RIV, por lo cual adopta el grado de vaginitis, que se diferencia de vaginosis. ‘VMI’ es tan solo el cambio de la nomenclatura preconizada por Donders¹⁴⁵ que originalmente denominó como “vaginitis aeróbica”.

BACOVA diagnostica y diferencia con alto valor predictivo la VB de la VMI. Además permite definir el riesgo actual de la mujer y generar la mejor orientación en el manejo de la evolución y de la indicación precisa de estudios adicionales especializados, que la VMI requiere de inmediato¹²⁵.

VMI es en realidad la “bolsa roja” de la DV, en la que partiendo de una mujer con desbalance en el contenido vaginal, se agrega RIV. Se deben diferenciar dos situaciones, las que se corresponden con VN entre 4 a 6 y las correspondiente a VN entre 7 a 10. En el primer caso las posibilidades etiológicas son múltiples (“bolsa roja”), es decir, se pueden encontrar agentes microbianos habituales de otros nichos, como el intestino, la boca, la piel y el ambiente, colonizando el contenido vaginal, que se informan como morfotipos bacterianos extraños al CV¹¹³. Sin embargo, es muy difícil atribuir condición etiológica en estos casos. En esta situación, para discernir la etiología implicada, es necesario recurrir a estudios microbiológicos complementarios que incluyan cultivo, a los efectos de identificar los microorganismos visualizados en la coloración de Gram ya sea como cocos Gram

positivos, bacilos Gram negativos compatibles con enterobacterias, bacterias corineformes o formas compatibles con *Actinomyces* spp.

En el segundo caso puede tratarse de una microbiota alterada, con predominio de morfotipos bacterianos principalmente anaeróbicos, asociado a la presencia de *Trichomonas vaginalis* en los exámenes microscópicos, agente causante de vaginitis, que explica el proceso inflamatorio vaginal, pero a diferencia del anterior, no requiere de cultivo para discernir la etiología¹¹³.

Sin embargo, es imprescindible considerar que la RIV detectada, puede tener origen no sólo en el epitelio vaginal, como son las vaginitis convencionales, sino también responder a infecciones en otros niveles del tracto genital o urinario. En estos casos se debe recurrir a realizar cultivo de endocervix para búsqueda de gonococos y clamidias y cultivo de orina, con lo que el informe BACOVA en sus observaciones permite sugerir la realización de estos estudios por pedido médico¹¹³.

Dado el proceso inflamatorio y descamativo involucrado, es frecuente la observación de células parabasales¹²⁵.

EVB V es poco común con una agresión por levaduras.

La permisividad que la disfunción vaginal primaria, es decir el desbalance de la microbiota habitual, induce en la mujer, genera un alto riesgo a todas las ITS, incluyendo la mayor frecuencia de asociación de trichomonas.

La incógnita a resolver es si la VB y la VMI son dos patologías con etiologías diferentes que pueden cursar en forma simultánea o si, por el contrario, reflejan un grado distinto de evolución de una misma disfunción orgánica. Podría decirse que es racional integrar los conceptos de VB y VMI, y considerar hipotéticamente que el síndrome se inicia con un desequilibrio orgánico de la mujer, que afecta la función de la mucosa del tracto genital, modifica el contenido vaginal y, así es como se inducen las alteraciones de la microbiota. El primer indicador concreto de esto es la reducción de la microbiota lactobacilar.

Un proceso similar al asignado entre la relación evolutiva de VB y la instalación de VMI, ha sido desarrollado para explicar la relación secuencial entre VB y la enfermedad inflamatoria pélvica¹⁴⁶. Los síntomas de la vaginitis microbiana son inespecíficos y ni el autodiagnóstico ni el diagnóstico clínico son confiables, por lo que se requiere la confirmación de laboratorio.

- ***Vulvovaginitis micótica***

La micosis vulvovaginal fue descrita por primera vez por JS Wilkinson en 1949, quien estableció una relación entre la existencia de hongos en la vagina y la aparición de una vaginitis. A partir de ese momento, los conocimientos fueron evolucionando progresivamente. Actualmente hablamos de vaginitis (vulvovaginitis) micótica o de hongos levaduriformes (VVL). Fue en 1931 cuando Plass *et al.* publicaron en American Journal of Obstetrics and Gynecology un estudio sobre la candidiasis vulvovaginal, y demostraron la patogenicidad de este agente levaduriforme¹⁴⁷.

Dentro del grupo de vaginitis convencionales, es decir producidas por una agresión microbiana, la VVL constituye una de las patologías de mayor frecuencia en la mujer adulta en edad fértil con cifras que oscilan alrededor del 15% y se elevan aún más en el embarazo, dado el incremento de estrógenos que acompaña a dicho estado, a valores entre 20 y 30%¹⁴⁸. De esta forma la VVL constituye la segunda patología más frecuente en todas las mujeres en edad fértil, luego de la VB. Inclusive durante el embarazo, representa la patología más prevalente seguida por la VB¹⁴⁸.

Un 75% de las mujeres presentan una infección candidiásica vulvovaginal en al menos una ocasión a lo largo de su vida; además, la mitad de ellas padece dos o tres episodios al año. En un 5 a 8% de las mujeres en edad reproductiva, se produce vulvovaginitis por levaduras recurrente, es decir la presencia de cuatro o más episodios a lo largo de un año; lo indiscutible es que las recurrencias suponen un reto para los ginecólogos y una alteración cierta para la calidad de vida de las mujeres¹⁴⁹. En nuestro país, la casi absoluta mayoría de las VVL son producidas por *Candida albicans complex*, con una prevalencia de entre 80% y 90%; en segundo lugar, se detecta *Candida glabrata* (entre 5% y 15%)¹⁵⁰. Otras especies relacionadas con las infecciones ginecológicas con menos frecuencia son *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis* y *Candida krusei*, entre otras, principalmente en pacientes inmunosuprimidos. En este sentido, durante los últimos años se han producido dos hechos posiblemente interrelacionados entre sí, un significativo aumento de la prevalencia de especies no *C. albicans*, y una mayor tasa de recurrencias de los episodios de vulvovaginitis. De hecho, el incremento de especies no *C. albicans* ha sido observado fundamentalmente en los episodios recurrentes¹⁵⁰. Por este motivo, en los casos de candidiasis recurrente deben identificarse las especies del género *Candida*, ya que otras especies como *C. glabrata complex* (5-10%), *C. tropicalis* (1-2%), *C. parapsilosis complex* (0,5-1%), *C. krusei* (0,5-1%) pueden producir vulvovaginitis. Además se deben detectar las candidiasis mixtas, es decir que coexisten dos especies diferentes en el mismo proceso.

Este incremento de especies no *albicans* ha sido relacionado con una generalización de terapias inadecuadas (automedicación), dado que las especies no *albicans* pueden ser resistentes a las drogas antifúngicas del grupo de los imidazólicos, ya sea por resistencia natural o adquirida, con lo cual se explicaría el fracaso de tratamiento con estos compuestos. La erradicación de *C. albicans* puede causar una selección de especies, como *C. glabrata*, resistente a diferentes agentes de uso común¹⁵¹.

En cuanto a la patogénesis de *Candida*, cobra importancia el proceso de adhesión. En este sentido, la capacidad de adhesión de *C. albicans* es superior a la de otras especies, y esto podría explicar la mayor frecuencia de esta especie en este tipo de infecciones. La adhesión tiene lugar por la unión a un receptor de la membrana (iCb3 y fibronectina) por parte de una proteína transmembrana de la membrana micótica (análoga a la integrina). Esta proteína micótica es capaz de anclarse en el receptor epitelial. Por otro lado, existen factores que pueden actuar como promotores o facilitadores del proceso de adhesión. En este sentido, un ambiente hiperestrogénico incrementa la exposición de los complejos epiteliales glicoproteicos que actúan como receptores, facilitando así la adherencia de los hongos a la superficie epitelial. De hecho la vulvovaginitis candidiásica es menos frecuente en situaciones de hipoestrogenismo (premenarquia, postmenopausia)^{152,153}.

Por otro lado, la gestación y la ingesta de anticonceptivos orales de alta dosis (ciertamente de escasa utilización en la actualidad) incrementan la tendencia a este tipo de infecciones. Otro factor que puede afectar la capacidad de adhesión de los hongos es la competencia con la microbiota vaginal, concretamente con los lactobacilos. Los lactobacilos inhiben la adhesión de esporas micóticas a la superficie epitelial mediante un proceso de co-agregación y competencia por los receptores. Una vez adheridas, las esporas son incapaces de penetrar en el epitelio vaginal y causar una vulvovaginitis. Para ello es necesaria la germinación de las esporas y el desarrollo de hifas y micelios. Una vez formados los micelios, *Candida* es capaz de penetrar e invadir. Este proceso de penetración se encuentra directamente relacionado con la producción de una serie de proteasas por parte de las hifas capaces de destruir proteínas con función defensiva a nivel de la mucosa vaginal^{152, 153}.

La microbiota vaginal, constituida por lactobacilos, representa la barrera defensiva más importante frente a la infección candidiásica. Los lactobacilos actúan a tres diferentes niveles. En primer lugar, compiten con los hongos por los nutrientes; en segundo lugar, mediante un proceso de coagregación son capaces de bloquear los receptores epiteliales

para los hongos, inhibiendo de esta forma la adhesión de estos al epitelio vaginal. Este mecanismo de defensa es el más importante. Finalmente, los lactobacilos son capaces de generar sustancias (las llamadas ‘bacteriocinas’) capaces de inhibir la germinación de micelios. Por otra parte, las pacientes inmunodeprimidas presentan vaginitis candidiásicas recurrentes con una alta frecuencia. Es evidente que los anticuerpos locales (IgA) juegan un papel fundamental en la defensa frente a micosis vaginales. Asimismo, tanto la vaginitis candidiásica oral como la vaginal se asocian a estados de inmunodepresión celular. Hasta un 70% de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) presenta algún episodio de candidiasis oral o vaginal¹⁵³.

En el caso de VVL típica, el pH del contenido vaginal es normal y el balance de lactobacilos y la microbiota anaeróbica (VN) también se mantiene normal. De esta forma, la VVL se asocia significativamente con el EVB II, es decir con VN de 0 a 3 y presencia de RIV. Las levaduras están presentes con frecuencia en el EVB I, pero generalmente al no haber adhesión a las células epiteliales, no inducen RIV y por lo tanto, se consideran colonizaciones habituales, que alcanzan entre el 15% y 25%, con mayor frecuencia en mujeres embarazadas (50%) y aquellas que utilizan anticonceptivos hormonales¹⁵⁴.

Los exámenes microscópicos que incluye BACOVA que permiten visualizar levaduras y su morfología son el examen en fresco con solución fisiológica, la coloración de Gram y la coloración de Giemsa¹¹³.

Otro examen microscópico en fresco para detección de levaduras, que no está incluido en BACOVA, es la visualización en fresco post agregado de KOH al 10%. Este examen eleva la sensibilidad en la detección de levaduras, asemejándose al cultivo, ya que el KOH destruye las células y leucocitos y permite la mejor visualización de los elementos levaduriformes¹⁵⁵.

BACOVA presenta adecuada sensibilidad en la detección de levaduras. Sin embargo, en pacientes sintomáticas pertenecientes al EVB II, principalmente si el pH es normal, en el caso de que BACOVA no detecte morfológicamente levaduras, se deberá intentar cultivo, antes de descartar VVL. El cultivo es un método confirmatorio¹¹³.

También se debe realizar cultivo en los casos de candidiasis recurrente, con el objeto de identificar las especies del género *Candida* y de detectar las infecciones mixtas. En estos casos es importante cultivar las levaduras, para posteriormente realizar las pruebas de identificación y sensibilidad correspondiente.

El género *Candida* desarrolla bien en medios de cultivo como el agar sangre. Otros medios de cultivo para el desarrollo de *Candida* son el agar Saboreaud y agar cromogénico (CHROM agar). Este último presenta la ventaja de que algunas especies de *Candida* pueden ser identificadas según el color que adquieren las colonias en este medio. Además dicho medio permite detectar los casos de candidiasis mixtas (10-20% de las VVL), ya que permite diferenciar por color las distintas especies.

La identificación de levaduras se realiza a través de métodos presuntivos como de la formación de tubo germinativo, formación de clamidocolidias, utilización de agar cromogénico, o bien de métodos definitivos como los paneles comerciales de identificación como el API, la espectrometría de masa.

Recientes publicaciones han demostrado la mayor sensibilidad de las técnicas de amplificación génica como la PCR, respecto del cultivo, para detectar las especies de *Candida* en el contenido vaginal en pacientes con candidiasis recurrente¹⁵⁶. Además esta metodología tiene la ventaja de permitir identificar en forma definitiva las distintas especies de *Candida*, lo que cobra relevancia en las VVL recurrentes.

- ***Vaginitis por Trichomonas vaginalis***

Trichomonas vaginalis (TV) fue descubierto por primera vez en 1836 por el francés Donné, quién lo encontró en secreciones vaginales y uretrales. Posteriormente Hoehne en 1916, comprobó que era el agente etiológico de una infección vaginal específica. Es un parásito unicelular flagelado, móvil, anaeróbico.

T. vaginalis mantiene su existencia asociada solamente a la especie humana y a diferencia de otros protozoarios parásitos humanos, en su ciclo evolutivo no desarrolla ningún estado intermedio de formas quísticas, sino que sólo se conoce el estado de trofozoito.

T. vaginalis se asocia etiológicamente a uretritis, vaginitis, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica e infertilidad tubárica¹⁵⁷

Sin que existan precisiones sobre su frecuencia relativa, un número significativo de las mujeres colonizadas (10 a 50%) se mantienen asintomáticas, de las cuales un 50% podrían presentar síntomas de infección dentro de los 6 meses posteriores¹⁵⁸. Cabe aclarar además que la mujer suele reinfectarse por contacto sexual con el hombre que suele actuar como portador asintomático¹⁵⁹.

La tricomoniasis afecta a aproximadamente 180 millones de mujeres en todo el mundo¹⁵⁷. *Trichomonas vaginalis* se identifica en el 30%/40% de las parejas sexuales masculinas de las mujeres infectadas. La tricomoniasis, representa una infección de transmisión sexual, que se asocia con frecuencia a otras enfermedades de transmisión sexual. Como tal muestra una mayor frecuencia en adolescentes hasta 25 años de edad, pero es detectada en toda la etapa de actividad sexual y aun en el climaterio¹⁶⁰.

La localización vaginal independiente de generar o no vaginitis activa, tiende a ser de persistencia crónica, mientras que la invasión uretral masculina, en individuos inmunocompetentes es de corta duración aun en ausencia de tratamientos específicos. Esto indica una adaptación evolutiva de TV al contenido vaginal.

La infección neonatal se ha reportado hasta en un 5 % de los niños que nacen de madres infectadas, produciendo complicaciones maternas y perinatológicas tales como rotura prematura de membrana, labor pretérmino y bajo peso al nacer¹⁶¹.

Los factores que determinan una colonización sin inducción de reacción inflamatoria vaginal (RIV) o la inducción de daño epitelial no están suficientemente aclarados

Se ha relacionado al parásito con un incremento en el riesgo de cancer cervical, como consecuencia de la evolución de la infección por el virus del papiloma humano (VPH)¹⁶². También se ha descrito que la tricomonosis se relaciona con una mayor transmisión e infectividad del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) debido a la acumulación local de linfocitos y macrófagos¹⁶⁰. Por otro lado, agentes espermicidas, tales como nonoxinol 9, ayudan a reducir la transmisión de la tricomoniasis.

En mujeres la tricomoniasis varía de un estado de portador asintomático de la enfermedad a un estado grave, agudo o inflamatorio.

Ninguna de las características clínicas de la vaginitis por tricomonas son suficientemente sensibles o específicas para permitir el diagnóstico de la infección basado en los signos y síntomas^{163, 164}

El pH vaginal se eleva considerablemente, y en la mayoría de los casos se detecta en la microscopía un aumento de los leucocitos polimorfonucleares.

La detección microscópica en el contenido vaginal y/o sedimento de orina siguen teniendo validez con valores predictivos positivo superiores al 90% que se agudizan en el caso de BACOVA que estudia el fresco donde son identificadas con total certeza en función de su movilidad. Además BACOVA incluye las coloraciones de Gram y Giemsa. La búsqueda en estas coloraciones debe realizarse en forma exhaustiva y cuidadosa en caso de no detectarse en fresco y sobre todo en presencia de una respuesta inflamatoria significativa. Dado que la coloración de Gram muestra baja sensibilidad y especificidad, se debe enfatizar la búsqueda en la coloración de Giemsa, que brinda mayor eficiencia y por lo tanto es confirmatoria¹¹³.

La presencia de TV determinada por morfología, mediante BACOVA se distribuye en general en los EVB IV y V, en este último, la mayoría de las veces, con RIV significativa y un pH elevado. Cuando las TV están asociadas al EVB V las pacientes frecuentemente refieren sintomatología y los parásitos son visualizados mediante los exámenes microscópicos que contempla BACOVA, dado el elevado número de parásitos presentes. De forma tal, que son los EVB III (MI), EVB IV (VB) y EVB V (VMI), los que favorecen la colonización y eventual RIV por TV. Con mucha menor frecuencia se pueden detectar TV en los EVB I (MN) y EVB II (MN con RIV). Cabe aclarar que la detección de TV en el EVB I, es decir sin RIV y acompañada de lactobacilos con pH normal, ocurre en pacientes asintomáticas, lo que puede ser interpretado como un estado de portador¹¹³.

La preparación en fresco es positiva para trichomonas móviles en tan solo 50% a 70% de los casos confirmados mediante cultivo¹⁶³. Tal es así, que en el caso de las observaciones microscópicas en fresco, la detección de *T. vaginalis* depende de la experiencia del observador y de la rapidez en el transporte y procesamiento de la muestra, para así evitar la pérdida de la movilidad del parásito¹⁶³. Por otro lado, las técnicas de cultivo tienen una alta sensibilidad (95%) y deben ser considerados en pacientes con elevado pH vaginal, aumento del número de leucocitos polimorfonucleares y ausencia de tricomonas móviles.

Asimismo, en pacientes asintomáticas el diagnóstico de laboratorio por examen microscópico presenta una baja sensibilidad (35-80%), motivo por el cual se requiere la utilización de otras metodologías más sensibles, como el cultivo¹⁶⁵. En estas pacientes, la detección mediante BACOVA resulta excepcional dada la baja cantidad de parásitos presentes como para ser detectados en los exámenes microscópicos directos.

Perazzi B. et al. evaluaron la sensibilidad y la especificidad de la microscopía, considerando el cultivo como método de referencia. La prevalencia del parásito obtenida por cultivo fue de 4,5%, siendo la detección por examen en fresco, coloración de May-Grunwald Giemsa, fresco con solución acética formolada (SAF)/azul de metileno, y por cultivo en medio líquido, de 1,3%, 1,8%, 1,8% y 4,5% respectivamente¹⁶⁶. La sensibilidad del examen en fresco fue del 30% para el May-Grunwald Giemsa, y el SAF/azul de metileno fue del 40%. Utilizando conjuntamente los tres exámenes microscópicos, la sensibilidad se elevó al 50% y la especificidad fue de un 100% para todos los exámenes microscópicos. El cultivo en medio líquido detectó el 100% de los casos positivos.

Recientemente, en pleno ajuste metodológico la amplificación génica parece establecerse como metodología que adicionada al cultivo, alcanzaría los mejores valores predictivos, pudiendo por lo tanto utilizarse ambas metodologías simultáneamente, lo que representaría un “gold-standard ampliado”.

Varios de los nuevos kits de diagnóstico rápido que utilizan sondas de ADN y anticuerpos monoclonales están disponibles, y poseen una sensibilidad del 90% y una especificidad del 99,8%¹⁶⁷.

Algunos autores han utilizado la reacción de polimerasa en cadena (PCR) para el diagnóstico de *T. vaginalis* y la compararon con el cultivo. Tal es así, que Randonjic *et al.* describieron una sensibilidad y especificidad de la PCR de 81.0% y 97.2 % respectivamente¹⁶⁸. Asimismo, Madico *et al.* relataron una sensibilidad y especificidad de la PCR de 97% y 98% respectivamente, utilizando “primers” dirigidos a la región conservada de los genes que codifican para la β -tubulina de *T. vaginalis*¹⁶⁹. Testardini *et al.* refirieron en un trabajo realizado en el Hospital de Clínicas sobre 386 contenidos vaginales de embarazadas sintomáticas y asintomáticas en el que se consideró la positividad en el cultivo o la PCR como método de referencia, que la sensibilidad de la PCR fue 83,3%, la del cultivo 75%, la del SAF/AM 50 % y la del examen en fresco y del MGG prolongado fue 45,8%. La especificidad resultó del 100% para todos los métodos. En la pacientes sintomáticas, la sensibilidad del cultivo y del SAF/AM fue del 100%, la del examen en fresco y del MGG prolongado 87,5% y la de la PCR 75%, mientras que en las asintomáticas la sensibilidad de la PCR fue 87,5%, la del cultivo 62,5% y la de los exámenes microscópicos 25%¹⁷⁰.

Estudio del contenido vaginal-BACOVA

El diagnóstico sindrómico de la DV no supera el 50% de valor predictivo positivo y negativo^{145, 159}. La literatura referente a las metodologías diagnósticas de la DV es vastísima y, entre muchos factores que hacen muy difícil su homologación, el más crítico resulta la falta de uniformidad para separar fehacientemente la vaginosis de la vaginitis típica (principalmente levaduras y/o tricomonas) y de la vaginitis microbiana.

El estudio microscópico normatizado (BACOVA) del contenido vaginal utiliza un algoritmo que se basa en establecer prioritariamente cinco estados vaginales básicos (EVBS), en función del VN y de la presencia de RIV¹¹³ que generan una sólida orientación predictiva en el diagnóstico de estados asociados a la DV¹¹³. BACOVA además agrega, con valores predictivos variables, la detección de levaduras (Le), trichomonas (TV), morfotipos extraños al contenido vaginal y células epiteliales no habituales que se distribuyen en los distintos EVBS, lo que potencia la capacidad diagnóstica de una manera significativa. Resultados obtenidos utilizando la misma metodología desarrollados en los últimos tres años en Argentina generan un espectro epidemiológico de alto valor que confirma la importancia del problema de DV¹¹³.

Los datos obtenidos en distintas series¹¹³ muestran diferencias relativas significativas en las frecuencias de diferentes EVBS, lo que plantea incógnitas sobre la influencia de factores “externos” sobre la sensibilidad de la mujer en edad fértil que desarrollan DV.

BACOVA se trata de un postulado morfológico independiente de todo criterio clínico. Basta recordar que en general se detecta DV evidente en un 50% de mujeres en edad fértil asintomáticas¹¹³.

La utilización de métodos tales como determinación de pH, olor a aminas y evaluación de enzimas, muestran valores predictivos inferiores a BACOVA, y en ningún caso permiten distinguir entre vaginosis y vaginitis con una sola determinación, realizable en todo laboratorio habilitado. La información brindada por el estudio de los EVB mediante BACOVA adquiere importancia definitiva para la toma de decisiones clínico terapéuticas.

De esta forma la identificación de vaginosis o vaginitis, define en principio las decisiones del requerimiento o no, de estudios complementarios racionales tales como los microbiológicos y/o citológicos.

Aun en el caso antes mencionado de TV y levaduras, su sola presencia es un indicador robusto, pero no definitivo de vaginitis. De no haber RIV, la colonización no es indicadora de patología. Su presencia en un contenido vaginal con RIV debe ser examinada cuidadosamente, a los efectos de no descartar otro factor desencadenante de la misma¹¹³.

Citología

Citologías alteradas, factores de riesgo para cáncer cervicouterino

El cáncer de cuello de útero es la tercera y cuarta causa de incidencia y mortalidad respectivamente por cáncer en mujeres de todo el mundo¹⁷¹ y responsable de un 5,2 % de todos los tumores en humanos¹⁷². Las células del cèrvix son muy activas en la vida reproductiva, por lo que la actividad constante promueve el crecimiento anormal de estas células, cuando se conjugan factores de riesgo para el desarrollo de patologías de cuello uterino. Esto se ha establecido como causa de la displasia cervical, patología relacionada con la presencia del virus de papiloma humano (VPH), que puede evolucionar a cáncer uterino^{172,173}. Los estudios epidemiológicos han demostrado que uno de los principales factores de riesgo en el cáncer cervico-uterino es la infección por VPH, este virus ha sido detectado en el 80 – 90% de las mujeres sexualmente activas¹⁷³.

Los VPH infectan las células epiteliales del huésped (queratinocitos) al interactuar con diferentes receptores de la superficie celular, como la integrina y los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG). Los VPH se replican utilizando el aparato de replicación de células huésped para expresar las oncoproteínas E6 / E7 / E5 para inmortalizar las células infectadas no solo inhibiendo los supresores tumorales p53 y Rb y disminuyendo la apoptosis, sino también de manera importante activando la vía de señalización PI3K / Akt / mTOR. Todos estos procesos mejoran la proliferación celular que conduce a la carcinogénesis¹⁷⁴.

Recientemente, la vía PI3K / Akt / mTOR se ha identificado como una importante vía de señalización para modular estrechamente muchos eventos celulares, incluidas las

actividades fisiológicas de factores mitogénicos u oncógenos, que conducen a la génesis de muchos cánceres humanos. La vía de señalización de PI3K / Akt / mTOR en células infectadas por HPV se activa a través de la mutación de los componentes de la ruta y la activación de las moléculas de señalización. La activación de esta vía contribuye a la inestabilidad genética, la desregulación de la proliferación, la resistencia a la apoptosis y los cambios en las características del metabolismo, lo que finalmente conduce a la transformación maligna de las células infectadas. Esta vía de señalización puede representar tanto una gran oportunidad terapéutica como un desafío práctico para tratar cánceres inducidos por VPH. Por lo tanto, una mayor comprensión de los mecanismos moleculares por los cuales la infección por VPH activa la vía de señalización PI3K / Akt / mTOR y los roles biológicos de esta vía en la carcinogénesis inducida por VPH mejorará la prevención de enfermedades, cuidado del paciente y estrategias de vigilancia para cánceres VPH positivos¹⁷⁴.

El cáncer de cuello uterino es considerado una enfermedad letal en mujeres, de hecho el 83% se produce en países en vías de desarrollo¹⁷³. En países desarrollados los Programas permiten detectar y tratar las lesiones adecuadamente, reduciendo drásticamente la incidencia y mortalidad de esta patología. Está demostrado que existen factores de riesgos que poseen suma importancia como cofactores del VPH en la génesis del cáncer cervicouterino¹⁷⁵. Entre los más importantes, se encuentran antecedentes de ITS, antecedentes obstétricos (partos y abortos), partos en la adolescencia, hábito de fumar y susceptibilidad genética.

El estudio BACOVA, con la incorporación de la lectura del CV mediante la tinción de Giemsa y con su vinculación con un proyecto paralelo del estudio de la Reaccion Inflamatoria Genital (ERIGE)¹⁷⁶, no solo eleva el valor predictivo positivo de la detección de trichomonas, de levaduras, de RIV y de la presencia de células guías, sino que también aumenta la posibilidad de detección de células indicadoras de alteraciones inflamatorias avanzadas y/o compatibles con estados infecciosos virales o estados proliferativos (ASC-US, LSIL, HSIL, etc). En una prolija evaluación de las células, el hallazgo de atipias colabora en orientar a decisiones tempranas para solicitar estudios confirmatorios¹¹³. La frecuencia con que se realizan estudios de contenido vaginal, en relación a citologías cervicales, incrementa la posibilidad de la detección temprana de lesiones pre-tumorales.

Métodos anticonceptivos; mecanismos de acción.

- *Anticonceptivos orales combinados*

Si nos centramos en la fisiología del ciclo menstrual, al inicio de este se encuentran elevadas las concentraciones de Hormona Folículo Estimulante (FSH), siendo bajas las de etinilestradiol y de progestágenos. Sin embargo, dosis exógenas de etinilestradiol al inicio del ciclo menstrual provocarían una fuerte inhibición en la producción de FSH, lo que impediría la diferenciación y la maduración del folículo dominante. La administración de etinilestradiol y de los progestágenos en la primera fase del ciclo inhibe el pico de estrógenos que tiene lugar a la mitad del ciclo, por lo que el estímulo necesario para que ocurra el pico de Hormona Luteinizante (LH) que desencadena la ovulación desaparece (en sangre, los niveles de estrógenos sintéticos están por debajo de las concentraciones necesarias para producir este efecto). Al impedir la ovulación, no se produce tampoco el cuerpo lúteo ni se segrega progesterona en la segunda mitad del ciclo. Por ende, la administración de anticonceptivos combinados inhibe tanto el desarrollo folicular como la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. Esta inhibición se ve reflejada en una marcada reducción de la secreción de estradiol ovárico y en la ausencia de la producción de progesterona¹⁷⁷.

Los anticonceptivos orales de altas dosis inicialmente comercializados en la década del 60 contenían altas dosis de estrógenos y progestágenos. Los estrógenos y los gestágenos a grandes dosis son capaces de inhibir por sí solos la ovulación, y utilizados en conjunto, su efecto sinérgico permite disminuir la dosis de cada uno¹⁷⁸. La inhibición sobre el eje hipotálamo-hipófisis es dosis dependiente; a menores dosis, los niveles basales de gonadotropinas son mayores¹⁷⁹. Si se considera a los Anticonceptivos orales combinados (ACO), que poseen etinilestradiol (EE2) y levonorgestrel (LNG) como progestágeno, puede decirse que ha habido una reducción de las dosis de ambos compuestos, que pasaron de 50 ug EE2/250 ug LNG a las dosis actuales de 30 ug EE2/150 ug LNG. Se conserva una relación entre ambos de 1:5, que parece ser necesaria para mantener un adecuado balance en el metabolismo de lípidos y carbohidratos⁹. Estos anticonceptivos, que contienen dosis menores de ambos compuestos, son llamados de ‘microdosis’, y contienen actualmente 20 ug EE2 y 100 ug de LNG¹⁷⁸.

Los ACO tienen efecto a distintos niveles en el aparato reproductor femenino. Estos efectos son los buscados según la finalidad con la que son administrados.

En primer lugar, al ser utilizados como contraceptivos, además del efecto antiovulatorio considerado como el mecanismo principal, se describen mecanismos secundarios, que consisten en los efectos sobre la migración espermática y sobre el endometrio. Estos mecanismos de acción secundarios actuarían en la medida que se produjera la ovulación, es decir, si fallara la inhibición de esta última como mecanismo principal. El efecto endometrial que pudiera alterar la capacidad de implantación del embrión puede constituirse como mecanismo anti-implantatorio. Este efecto impide la nidación de un embrión en su primera semana del desarrollo¹⁷⁸. Los estrógenos y la progesterona sintéticos reemplazan las hormonas ováricas, cumpliendo las mismas funciones, principalmente la acción sobre el epitelio vaginal. El estímulo estrogénico incrementa el espesor del epitelio y el progestacional lo hace madurar, cargándolo de glucógeno¹⁷⁷.

El microambiente, con su microbiota vaginal regulado fundamentalmente por un sistema hormono-inmunológico, puede ser protegido o interrumpido por una gran variedad de factores, entre ellos, los métodos anticonceptivos. Han sido demostrados resultados indicativos de que la utilización de anticonceptivos orales combinados se asocia a una estabilidad de la microbiota vaginal y a la corrección de la disfunción vaginal^{180,181,182}. Asimismo Vodstrcil *et al.*, además de plantear la influencia protectora de las hormonas esteroides exógenas en el ambiente vaginal, demostraron que más del 50 % de las mujeres que experimentaban VB recurrente luego del tratamiento con antibióticos de primera línea, al recibir anticoncepción hormonal mostraron una mejora significativa en la recurrencia de esta DV¹⁸².

- ***Dispositivo intrauterino medicado con cobre***

Los dispositivos intrauterinos (DIU) se popularizaron para uso anticonceptivo reversible a partir de los años sesenta. Los primeros no eran medicados y consistían solo en lo que ahora se conoce como la estructura del dispositivo intrauterino, que era de plástico. Con los años, estos dispositivos se reemplazaron por dispositivos más efectivos hechos de cobre. Estos últimos tienen diferentes formas, aunque la principal distinción entre estos y los de plástico radica en que los de cobre tienen una estructura definida (en forma de T o de

herradura) y los otros no. Los dispositivos con estructura permanecen en la cavidad uterina por medio de los "brazos" horizontales extendidos, mientras que los dispositivos carentes de estructura se fijan en la pared del fondo uterino¹⁸³.

Los dispositivos intrauterinos de cobre, en general, constan de una estructura central de plástico, revestida con hilos de dicho metal; existen algunos que tienen una estructura de plata para retrasar la fragmentación del cobre y aumentar la vida útil. Los primeros dispositivos que se realizaron contenían cobre únicamente alrededor del tallo vertical¹⁸⁴. Fueron los desarrollos posteriores los que llevaron a la incorporación de cobre adicional y a que se agregasen mangas también de cobre a los brazos horizontales de los dispositivos en forma de T, con el propósito de proporcionar una superficie de dicho metal cerca del fondo y, así, mejorar la efectividad¹⁸⁴.

El principal mecanismo anticonceptivo de los dispositivos intrauterinos de cobre es el de impedir la fertilización al evitar la movilidad del esperma y estimular una reacción inflamatoria citotóxica que es espermicida. Además, cambia el medio intrauterino al hacerlo más hostil para la implantación. Las tasas de fracasos son más altas al comienzo de su uso y parecen estar positivamente correlacionadas con la superficie de cobre en la cavidad endometrial^{184, 185}. En ocasiones, es difícil insertar los DIU, pero las complicaciones durante la inserción como, por ejemplo, el desgarro cervical o la perforación uterina son poco frecuentes¹⁸⁵. El aumento en el sangrado vaginal o la prolongación de éste ha sido descrito como el efecto secundario más común¹⁸⁶ y podría estar relacionado con el contenido de cobre del dispositivo intrauterino. Por lo tanto, aumenta la preocupación de que esto puede disminuir la tolerancia y el cumplimiento con dispositivos de alto contenido de cobre. Los dispositivos más pequeños y con menos contenido del metal tienen como objetivo minimizar los efectos secundarios y proporcionar una alternativa para las mujeres con úteros pequeños; no obstante, es posible que sean menos efectivos. Otros efectos secundarios informados son dolor abdominal, en especial durante la menstruación, y flujo vaginal¹⁸⁷.

En general, la posible asociación entre el uso de dispositivos intrauterinos y la enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) ha sido una preocupación que ha llevado a una disminución del uso del dispositivo intrauterino, especialmente en EE. UU¹⁷⁰. En este sentido, no se

observaron diferencias significativas entre los numerosos tipos de dispositivos intrauterinos con estructura de cobre¹⁸⁷.

La relación entre disfunción vaginal y el DIU no es muy clara, y en la bibliografía hay muchas discordancias. Algunos estudios han mostrado un aumento en el riesgo de vaginosis bacteriana en usuarias de DIU, mientras que otros estudios no han encontrado asociación alguna^{139,188, 189, 190, 191, 192,193,194}. Una posible explicación para una asociación entre el uso del DIU y la adquisición de VB que se sostuvo en los últimos años es la de considerar que ese aumento de bacterias anaeróbicas en la vagina, característica de la VB, podría responder a la presencia del hilo en la vagina, o de un cuerpo extraño en el útero, o bien al aumento de volumen y la duración del flujo menstrual en los usuarios de DIU de cobre^{190,193}.

- ***Métodos de barrera: el preservativo masculino***

Los métodos de barrera incluyen el condón masculino y los métodos femeninos (condón femenino, capuchón cervical, diafragma y espermicidas). En general, el más utilizado es el condón masculino, y es el método de barrera considerado en este estudio, cuyo uso se ha incrementado actualmente por el riesgo a infectarse con el VIH. Su tasa de fracaso en la población adolescente es de aproximadamente 14%, aunque si se usa correctamente, esta puede disminuir a 3%¹⁹⁵.

El preservativo masculino, que consiste en una funda delgada que se coloca sobre el glande y el cuerpo del pene, está diseñado para prevenir el embarazo al actuar como barrera física contra el depósito de semen en la vagina durante el coito. A principios de los años noventa, se desarrollaron los preservativos masculinos sin látex, compuestos por una película de poliuretano o de elastómero sintético, para proporcionar métodos alternativos masculinos de barrera a individuos que, debido a alergias, sensibilidad o preferencias, no pudieran utilizar sistemáticamente los preservativos de látex. Los preservativos sin látex se asociaron con mayores tasas de roturas clínicas en comparación con los preservativos que sí tiene. La eficacia anticonceptiva de los preservativos sin látex requiere más investigación¹⁹⁶.

Cuando se combina con cremas o geles espermicidas (que contengan, por ejemplo, nonoxinol-9), su eficacia anticonceptiva aumenta, pero en la bibliografía se hace referencia

a estudios de dermatitis vaginales, vulvovaginitis alérgicas e irritativas y estados inflamatorios asociados al uso de preservativos. Se hace mención a influencia del látex, aunque hay mayor acuerdo en asignar causalidad a los espermicidas (nonoxinol- 9)¹⁹⁷.

El hecho de que la mucosa vulvar no esté queratinizada, y de que la humedad en la que se encuentra inmersa favorezca la penetración de agentes irritantes y alérgenos, genera estados típicos de vaginitis con reacción inflamatoria vaginal^{198, 199}

- ***Métodos Naturales: método del ritmo***

Los métodos basados en el conocimiento de la fertilidad de la mujer constituyen métodos anticonceptivos basados en la abstención del coito vaginal en los momentos fértiles del ciclo sexual²⁰⁰.

La OMS define la abstinencia periódica como el método natural con el que se evitan, voluntariamente, las relaciones sexuales de la pareja durante la fase fértil del ciclo menstrual, con el fin de evitar un embarazo no deseado. Por ello se los denomina ‘métodos anticonceptivos basados en el conocimiento de la fertilidad’ (MBCF), o ‘métodos naturales’²⁰¹. Dentro de este grupo se incluyen el método del ritmo, el del moco cervical, el de la temperatura basal y el sintotérmico.

El método del ritmo fue desarrollado en 1924 por el ginecólogo japonés Kyusaku Ogino y luego fue perfeccionado por el médico austriaco Hermann Knaus en 1928, y constituye el primer método de planificación familiar. Consiste en encontrar la cantidad de días en la fase infértil pre-ovulatoria. Para esto, se debe registrar durante 6 meses la duración de los ciclos menstruales, y luego se debe proceder al cálculo matemático: como el día de ovulación es el decimocuarto antes del primer día de menstruación, se resta 18 al número de días del ciclo más corto, para encontrar el inicio de la fase infértil, que inicia luego de que haya ovulado. Por lo tanto, se resta 11 al número de días del ciclo más largo. Ese rango constituye el periodo fértil, durante el cual no se puede tener relaciones. El método se basa en no tener relaciones sexuales durante el período de ovulación²⁰⁰.

Para una mujer cuyo ciclo menstrual se extiende entre 25 y 32 días, se estima que es infértil los primeros 7 días de su ciclo ($25 - 18 = 7$), que es fértil entre los días 8 y 20, y que vuelve a ser infértil el día 21 ($32 - 11 = 21$). Cuando se trata de evitar el embarazo,

usándose perfectamente, este método tiene un nivel de efectividad de en torno al 80% (tasa de error del 20%-25% según los estudios)^{200, 201, 202, 203}.

Con respecto a la influencia del método del ritmo, demostraron una tendencia a la protección de la microbiota, que podría estar relacionada con un microambiente vaginal sometido exclusivamente bajo la influencia hormonal sistémica y con la abstinencia sexual prolongada, sin exposición local a modificadores de pH como el semen y leucocitos²⁰⁴.

- ***Métodos de doble protección: anticoncepción y protección de infecciones de transmisión sexual (ITS)***

El término ‘doble seguridad’ es una adaptación informal del término *double dutch*, acuñado en Holanda, y que realmente quiere decir *doble holandés*. Conceptualmente, hace referencia al doble uso de métodos anticonceptivos (preservativo para el varón y píldora anticonceptiva para la mujer) como doble protección frente a la transmisión de una ITS, por un lado, y de un embarazo no deseado, por otro²⁰⁵. Esta es una estrategia con un doble enfoque preventivo válida para los adolescentes y jóvenes, por el alto riesgo de contraer una ITS. Pueden combinarse, por ejemplo, la píldora o los inyectables con el condón. Otras combinaciones también son válidas^{205, 206}.

Programas de Salud sexual y Procreación Responsable

La salud sexual y reproductiva constituye en nuestros días una de las principales áreas de intervención en materia de cooperación para el desarrollo y la salud de los pueblos, e inclusive constituye uno de los compromisos internacionales. Desde mediados del siglo XX, la salud es reconocida como uno de los derechos fundamentales del ser humano y como condición clave para una vida digna. Dentro de la Declaración Universal de los Derechos humanos (1948) se recoge por primera vez una alusión directa a la salud materna e infantil (art.25.2)^{207, 208}.

Posteriormente, luego de varios años de trabajo relacionado con la asistencia materna e infantil, se logró en la Conferencia Internacional sobre Población y Desarrollo de Naciones Unidas (El Cairo, 1994) afianzar el concepto de salud sexual y reproductiva, y con él se recogió el componente social de la salud, haciendo énfasis en el ejercicio de los derechos sexuales y reproductivos²⁰⁹.

El término ‘salud materna e infantil’ fue reemplazado por el concepto de ‘salud sexual y reproductiva’, y con esto se dejó atrás una dependencia de la mujer que la relacionaba exclusivamente, como madre y cuidadora, a la mortalidad y morbilidad materna. De esta forma, el concepto de ‘salud reproductiva’ quedó definido, en la actualidad, como “un estado general de bienestar físico, mental y social y no de mera ausencia de enfermedad o dolencia, en todos los aspectos relacionados con el sistema reproductivo, sus funciones y procesos. Entraña además la capacidad de disfrutar de una vida sexual satisfactoria y sin riesgos, de procrear, y la libertad para decidir hacerlo o no hacerlo, cuándo y con qué frecuencia” (FNUAP 2004). Desde esta visión, el término ‘salud reproductiva’ presenta una concepción holística de la salud en relación con la sexualidad y con la reproducción²⁰⁹.

Entre algunos derechos sexuales y de reproducción enunciados por los médicos del mundo en el año 1999, se destaca **el derecho a la información y a la educación sobre la sexualidad, el poder contar con servicios de atención primaria y centros sanitarios de calidad y con medidas de protección a la maternidad**²¹⁰. Estos derechos deberían ser impulsados a todos los trabajadores de la salud —en especial entre los pequeños centros que identifican sus medios y que conocen las condiciones sociales, culturales y económicas de la población— a fin de que se lleven a cabo los programas sobre cuidados de la salud sexual y que, en lo posible, se logrará realizar un programa propio que atienda y responda específicamente a las necesidades y problemas detectados en cada Institución.

Un elevado porcentaje de mujeres afronta riesgos en su salud sexual y reproductiva, en particular las más jóvenes padecen riesgos específicos debido a su biología, a la discriminación respecto al acceso a la información y a los servicios y a los límites que la sociedad le impone a su comportamiento. Como resultado, esta porción de la población resulta más vulnerable a tres condiciones que representan una amenaza: embarazo no deseado, aborto en condiciones de riesgo e infecciones de su tracto genital que pueden asociarse a complicaciones ginecológicas, como infertilidad, y hasta pueden desencadenar la muerte.

A nivel mundial, un tercio de las 358.000 muertes maternas anuales son atribuibles a los embarazos no deseados, que en su mayoría se producen en países de bajos y medianos recursos²¹¹. La mejora en el acceso a los servicios de planificación familiar se traduciría en reducciones marcadas de los embarazos no deseados y de abortos inseguros, y una

disminución de muertes maternas y neonatales²¹². Asimismo, a los riesgos sustanciales de muerte por causa de complicaciones durante el embarazo²¹³, se suma el mayor riesgo de adquisición de VIH y de otras infecciones de transmisión sexual^{214, 215}. La provisión de anticoncepción segura y efectiva ha sido incorporada por la Organización Mundial de la Salud como una estrategia primaria para la prevención de embarazos no deseados, abortos, infecciones pediátricas y muertes²¹⁶.

,



HIPÓTESIS

El microambiente vaginal, regulado fundamentalmente por un sistema hormono-inmunológico, puede ser protegido o interrumpido por una gran variedad de factores, entre ellos, los métodos anticonceptivos. Principalmente el estrógeno ovárico reemplazado por el estrógeno exógeno de los anticonceptivos hormonales podrían garantizar glucógeno en las células intermedias del epitelio vaginal, una buena concentración de lactobacilos, una adecuada producción de ácido láctico y un pH fisiológico normal, que permitiría un estado vaginal básico normal. En el método del ritmo, que está bajo la influencia del estrógeno ovárico, y en ausencia de otros factores, se mantendrían las condiciones fisiológicas normales. Sin modificación sistémica, los dispositivos intrauterinos liberadores de cobre e inhibidores de la fecundación como cuerpo extraño podrían generar cambios celulares y bioquímicos, mientras que los preservativos de látex con lubricantes o espermicidas podrían actuar sobre ese epitelio vaginal no queratinizado, alterando su equilibrio y, en consecuencia, podrían impactar en la alteración de la microbiota vaginal normal.

De esta forma, se espera que los resultados obtenidos puedan aportar datos importantes, especialmente referidos a la influencia de los distintos métodos anticonceptivos sobre los estados de disfunción vaginal, y en particular a las infecciones del tracto genital inferior que contribuirán a su estudio, y que, en definitiva, podrían optimizar la atención primaria de la mujer en edad fértil a los efectos de mejorar su calidad de vida.



OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la influencia sobre la microbiota vaginal de los métodos anticonceptivos utilizados por mujeres provenientes de una comunidad socialmente uniforme, con similares perfiles educativos y económicos, y que asisten a los controles de planificación familiar en centros de atención primaria de la salud.

Objetivos específicos

- Aportar datos epidemiológicos locales para optimizar la atención institucional.
- Evaluar la asociación de los estados vaginales básicos con los diferentes métodos anticonceptivos
- Definir estados normales y patológicos e identificar con un alto valor predictivo mujeres en riesgo gineco-obstétrico según el método anticonceptivo.
- Relacionar el método anticonceptivo con agentes microbianos específicos de vulvovaginitis, tales como levaduras y *Trichomonas vaginalis*
- Caracterizar en forma fenotípica y genotípica las especies de lactobacilos relacionadas a la microbiota normal en las pacientes en anticoncepción
- Relacionar la microbiota vaginal y los factores de riesgo para el cáncer cervicouterino con el resultado de citologías alteradas en mujeres que consintieron el estudio de PAP

***MATERIALES Y
MÉTODOS***

✓ Descripción del ámbito de estudio

Mujeres de 14 y 45 años atendidas en centros de salud públicos y privados de dos localidades del interior de la Provincia de Santa Fe, que concurren a los controles de Planificación familiar al inicio, 3 y 6 meses posteriores a la utilización del método anticonceptivo en forma ininterrumpida, de quienes se obtuvieron muestras de contenido vaginal. Cada paciente tuvo su respectiva historia clínica donde se documentaron datos relacionados con aspectos clínicos actuales y antecedentes epidemiológicos.

• *Tipo de estudio y diseño*

Prospectivo consecutivo, experimental, longitudinal, de prevalencia y de carácter descriptivo. Se evaluó la proporción de mujeres con disfunción vaginal atendidas en centros de salud público y privado en relación a los diferentes métodos anticonceptivos utilizados.

• *Universo o población objetivo*

Tamaño de la muestra: Incluyó a mujeres comprendidas entre 14 y 45 años que concurren al servicio de atención médica de la comunidad, ya sean usuarias de los servicios públicos o de los privados. En la localidad de Sa Pereira (1800 habitantes), 250 mujeres corresponden a ese intervalo de edad y en la localidad de Mariano Saavedra (550 habitantes), corresponden 120 mujeres que concurren al Servicio.

Criterio de inclusión:

- Mujeres de 14 a 45 años, habitantes de las localidades incluidas en el estudio y usuarias tanto del servicio público como del privado
- Sexualmente activas
- Que aceptaron el examen ginecológico y la toma de muestra para los análisis de laboratorio
- Que respondieron el 100% del cuestionario individual

Criterio de exclusión:

Los criterios de exclusión se aplicaron tanto para el estudio inicial, como para los controles a los tres y seis meses posteriores.

- Mujeres no radicadas en las poblaciones incluidas
- Mujeres embarazadas
- Población migrante
- Mujeres que no aceptaron el total de las condiciones del estudio
- Mujeres con algún grado de discapacidad mental que les impidió dar su consentimiento
- Mujeres que estaban bajo tratamiento en el momento del estudio o en los últimos seis meses, tanto local como sistémico, con antibióticos, antimicóticos, corticoides, antiparasitarios o inmunosupresores; excepto para las mujeres sintomáticas que requirieron tratamiento por detectarse una infección vaginal.

Población accesible. Muestra. Selección y tamaño de la muestra. Análisis de sesgos.

Considerando las dos poblaciones de mujeres que cumplieron con el requisito de la edad, el criterio aplicado para seleccionar la muestra fue el volumen de demanda de los centros de salud incluidos en el estudio. El muestreo se elaboró considerando el promedio de mujeres que concurrieron a los centros de salud. Como los criterios de inclusión restringieron el tamaño del universo, la determinación del tipo de muestra (probabilística o no probabilística) dependió de la cantidad de personas posibles que fueron evaluadas en el tiempo establecido. Se alcanzó 62,4 % y 20% del total de la población femenina de 14 a 45 años concurrentes a los Servicios de atención de la localidad de Sa Pereira y de San Mariano respectivamente. Cabe señalar que los porcentajes descriptos no consideran las mujeres que reiniciaron método anticonceptivo después de 6 meses de suspensión.

✓ Procedimientos para garantizar los aspectos éticos

Consideraciones generales de ética de la investigación

Se tomaron medidas estrictas para mantener la confidencialidad y la privacidad de cada participante en todas las etapas del estudio. Para eso se asumió el compromiso de no dar ninguna información que permita identificar a las participantes. Solo se incluyeron aquellas mujeres que firmaron el consentimiento después de haber sido informadas de todas las

etapas y características del estudio, y conservaron el derecho a interrumpir su participación sin perjudicar su relación con la institución. Se efectuó el protocolo de acuerdo con las normas éticas establecidas, que contó con el aval del Comité de Bioética del Hospital de Clínicas (Ciudad Autónoma de Buenos Aires).

El consentimiento informado se implementó en la aplicación del cuestionario y del examen ginecológico. El formulario incluyó a) significado de la participación en el estudio; b) confidencialidad; c) derecho a rehusar la participación sin perjudicar su relación con la institución o con individuos relacionados con la investigación; d) derecho a rehusar contestar preguntas específicas durante la entrevista; f) derecho a interrumpir su participación en cualquier momento.

Para garantizar la confidencialidad y el anonimato se siguieron estrictamente los siguientes procedimientos: cada participante tenía un código que vinculaba su cuestionario con la muestra correspondiente enviada al laboratorio y, por lo tanto, los resultados no se conocían durante el trabajo de campo.

✓ **Selección de técnica e instrumento de recolección de datos**

Fuentes primarias y secundarias. Prueba piloto del instrumento.

Se utilizaron datos primarios que se obtuvieron del cuestionario individual cumplimentado en el momento de la entrevista del personal capacitado con la participante.

Cuestionario individual

El cuestionario incluyó preguntas que debían responder según las opciones indicadas y fueron extraídas y adaptadas de la encuesta demográfica de salud (ENDESA 2001. “Encuesta Nicaragüense de demografía y salud”) ²¹⁷. Se realizó un prueba piloto con 20 entrevistas para evaluar la validez y la profundidad de las preguntas, y se seleccionaron aquellas que eran comprendidas y que respondían al lenguaje de la población en estudio. Para un análisis más satisfactorio, dentro de las 20 mujeres incluidas se consideraron las edades y se tomaron según el siguiente detalle: 8 de 14 a 25 años, 6 de 25 a 35 años y 6 de 35 a 40 años.

✓ **Contenido vaginal**

Toma de la muestra del contenido vaginal

Posterior a la lectura de las características del estudio, la aceptación con la firma del consentimiento informado y el cuestionario cumplimentado, se procedió a la toma de muestra de contenido vaginal de fondo de saco posterior con hisopo. Se realizó un estudio basal al iniciar el método anticonceptivo y luego de dos controles a los tres y seis meses de su utilización ininterrumpida, cumpliendo estrictamente la metodología BACOVA¹¹³. La muestra fue obtenida entre los días 10 y 20 del ciclo menstrual.

Se utilizaron hisopos estériles para garantizar la bioseguridad a la paciente. Fue fundamental la estandarización del tipo de hisopo a usar, de forma de asegurar uniformidad para todos los estudios, así como mantener la misma cantidad y moldeado del algodón hidrófilo utilizado.

Para el estudio morfológico (examen en fresco y coloraciones) se utilizaron dos hisopos con mango de madera y torunda de algodón (Classiq Swabs by COPAN) y un hisopo con medio de transporte Stuart para cultivo (Sterile transport Swab COPAN).

Procedimiento:

- En cada oportunidad se indicó a las voluntarias cómo ubicarse en posición ginecológica, y una vez introducido correctamente el espéculo (sin lubricante), con suficiente iluminación, se localizó la posición del cuello de útero y se verificó la posibilidad de acceso directo al espacio virtual existente por debajo del mismo o también denominado fondo de saco vaginal. Se procedió a introducir un primer hisopo y a tomar, con movimientos rotatorios, sin presionar sobre las mucosas vaginales, material de la secreción acumulada en ese sitio. Se evitó tocar las paredes del espéculo o de la región externa vaginal al retirar el hisopo. Se repitió el procedimiento con un segundo hisopo.
- En condiciones de escaso volumen líquido, acumulado en el fondo de saco, se evitó el raspado de la mucosa vaginal.
- Una vez tomada la primera y segunda muestra, los hisopos se introdujeron, uno en el tubo seco (material destinado a extendidos para coloraciones) y el segundo en el tubo con 0,5 ml de solución fisiológica para examen en fresco.
- Se realizó una tercera toma de fondo de saco y se introdujo en el tubo que contiene medio de transporte Stuart para realizar los cultivos.

Estudio del contenido vaginal

Examen en fresco

Se trabajó con el hisopo transportado en el tubo con 0.5 ml de solución fisiológica estéril, que se homogeneizó manualmente, tratando de transferir la mayor cantidad de material a la fase líquida. Se colocaron gotas de la suspensión entre el porta y el cubreobjetos para la observación en fresco.

Esta etapa requirió el mayor esfuerzo operativo para que la preparación y la lectura microscópica se realizaran lo antes posible para aumentar la sensibilidad del diagnóstico de trichomonas (TV), de bacterias móviles, y para asegurar estabilidad de la morfología celular.

Coloración de Gram

Utilizando el hisopo sin agregado de solución fisiológica, se hicieron extendidos en portaobjetos desengrasados, limpios y secos, generando una capa fina. Se fijó por calor y se procedió a la tinción de Gram.

Coloración de Giemsa

Se utilizó el mismo hisopo usado para la coloración de Gram. El extendido requirió un proceso de fijación distinto y crítico. Se procuró realizar los extendidos en forma inmediata a la recepción de la muestra, en forma simultánea a la preparación del material para el examen en fresco.

La realización de las tinciones (post fijación) permitió un espacio de tiempo en el que se pudo completar la lectura del preparado en fresco.

Estudio morfológico del contenido vaginal

Aplicando estrictamente la metodología BACOVA,¹¹³ e integrando el estudio morfológico del contenido vaginal (CV) en fresco y en extendidos teñidos con la coloración de Gram y Giemsa, se calculó el valor numérico de la microbiota vaginal (VN) y se evaluó la reacción inflamatoria vaginal (RIV).

- ***Cálculo del valor numérico***

Aplicando el criterio de Nugent, el VN expresado de 0 a 10 fue calculado de acuerdo a la proporción de morfotipos bacterianos habituales del contenido vaginal en un extendido coloreado con Gram: 0 a 3, microbiota normal (prevalencia de lactobacilos); 4 a 6, microbiota intermedia (disminución de lactobacilos - aumento de la microbiota habitual principalmente anaerobia) y 7 a 10, microbiota alterada (disminución significativa o ausencia de lactobacilos, con franco relativo dominio de bacterias anaerobias) (Tabla 2).

- ***Corrección del VN por la adición de dos puntos en caso de la detección de células guía para EVB IV (vaginosis bacteriana)***

La detección de células guía en cualquiera de los extendidos, independientemente de su número, significó la corrección del valor numérico básico de Nugent, sumando dos puntos cuando este se ubicó entre 0 a 6. Valores numéricos de 7 o más fueron considerados, de hecho, indicadores de franca alteración de la microbiota vaginal y no requirieron corrección.

Tabla 2: Interpretación de la coloración de Gram del contenido vaginal según el criterio de Nugent

MORFOTIPOS EN LA COLORACIÓN DE GRAM	Valor numérico (N° de elementos/campo)				
	0	1	2	3	4
Bacilos rectos Gram Positivos compatibles con <i>Lactobacillus</i> spp	> 30	5 – 30	1 -4	< 1	0
Cocobacilos Gram-variables tipo anaerobio compatibles con <i>Gardnerella vaginalis</i>	0	<1	1 -4	5-30	>30
Bacilos Gram-variables curvos compatibles con <i>Mobiluncus</i> spp.	0	1 -4	5 - >30	-	-

- ***Reacción inflamatoria vaginal***

La RIV se informó en función del número de leucocitos presente en el contenido vaginal, medido en forma simultánea con el VN en la coloración de Gram y confirmado con la coloración de Giemsa. Se expresó en forma numérica única calculando el promedio del número de leucocitos dentro de 10 campos microscópicos no adyacentes. Se consideró el valor de corte de 5 leucocitos por campo (utilizando 1000X de aumento microscópico).

- **Definición de estados vaginales básicos (EVBs)**

Al integrar el valor numérico de Nugent (VN) y la reacción inflamatoria vaginal (RIV), se definieron cinco EVBs (Tabla 3): I) microbiota normal (MN), II) microbiota normal con RIV (MN+RIV), III) microbiota intermedia (MI) con alteración incipiente y sin RIV, IV) vaginosis bacteriana (VB) —microbiota significativamente alterada sin RIV—, y V) vaginitis microbiana inespecífica (VMI) —microbiota alterada con RIV significativa, La presencia de levaduras y TV se incorporó al análisis.

Tabla 3: Estados vaginales básicos en mujeres en edad fértil, según metodología BACOVA

EVB EN MUJERES EN EDAD FÉRTIL:	VN	RIV
I Microbiota Normal Predominio de lactobacilos	0 a 3	NO
II Microbiota Normal + RIV Predominio de Lactobacilos, pero reacción inflamatoria vaginal presente	0 a 3	SI
III Microbiota Intermedia Equilibrio de lactobacilos y bacterias anaeróbicas	4 a 6	NO
IV Vaginosis bacteriana Predominio de bacterias anaeróbicas	7 a 10	NO
V Vaginitis microbiana inespecífica Alteración de la relación de lactobacilos y anaeróbicos con reacción inflamatoria	4 a 10	SI

VN: valor numérico – RIV reacción inflamatoria vaginal

Crterios agregados

La detección de levaduras y/o trichomonas, y la presencia significativa de morfotipos bacterianos extraños de importancia predictiva, se expresó en forma cualitativa.

Se realizó un prolijo examen para la detección de anomalías celulares en el CV que fue comparado con resultados de la citología exfoliativa realizada por el Laboratorio de Procesamiento de Papanicolau “Dr. Daniel Rocco” Ministerio de Salud Provincia de Santa Fe.

Cultivo de los contenidos vaginales

Los cultivos se realizaron en:

- Medios enriquecidos con hemo (hemina, hemoglobina o sangre) al 5% y la atmósfera enriquecida en 5 % de CO₂ con incubación de 48 h. para el aislamiento de lactobacilos en microbiotas normales ^{106,218}.
- Medio Tioglicolato modificado para incrementar la sensibilidad en la detección de *Trichomonas vaginalis* con incubación 7 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Se examinó por observación microscópica diaria en busca de parásitos móviles ²¹⁹.
- Medio cromogénico para aislamiento y diferenciación presuntiva de las especies prevalentes de *Candida* (*CHROMagar Microbiology Paris France*). Después de 48 h. de incubación (30 – 37 °c) se procedió a la lectura de las placas. El medio *CHROMagar Candida* descrito por Odds. y Barnaerts en 1994, garantiza un 99% de sensibilidad y especificidad en la identificación y diferenciación del complejo de *C. albicans* (colonias verdes), *C. tropicalis* (colonias color azul metálico), *C. krusei* (colonias color rosa vellosa) y otras especies (colonias color blanco o crema) ²²⁰. Se incorporó al estudio los siguientes ensayos: producción de tubo germinativo y producción de clamidosporas en agar leche²²¹.

Conservación de cepas

Las cepas aisladas se subcultivaron en caldo o agar Mann Rogosa Sharp (MRS, Britania) a 37°C durante 24-48 horas y para el crecimiento en agar se emplearon bolsas con generadores de atmósfera de CO₂ de un 10 % (GENbag – Laboratorio BIOMÉRIEUX). Como medio de conservación a corto plazo se utilizó medio agar y caldo MRS a 4-8°C con pases mensualmente. Para la conservación a largo plazo, se utilizó la línea CryoBank (Laboratorio COPAN) congelada a – 20°C.

Identificación fenotípica por pruebas bioquímicas de los aislamientos de lactobacilos

Se aislaron los lactobacilos provenientes de los contenidos vaginales, obtenidos en los controles (3 y 6 meses) con EVB I o II de microbiota normal. Una vez purificados los aislados correspondientes a bacilos no esporulados, Gram positivos y catalasa negativos fueron caracterizados como género *Lactobacillus* dentro del grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) a través de las siguientes pruebas bioquímicas: morfología, producción de CO₂ a partir de glucosa, crecimiento en el medio Man, Rogosa y Scharpe (MRS) a 10 y 45°C, y tolerancia a 6,5 y 18% de ClNa.^{221,222}.

- *Clasificación según fermentación de azúcar de forma homo- ó heterofermentativa*

Para evidenciar presencia o ausencia de las enzimas fructosa -1,6- difosfato aldolasa y fosfoacetolasa y subclasificar los lactobacilos como homofermentativos obligados (HOO), heterofermentativos facultativos (HF) o heterofermentativos obligados (HO) se siguieron las siguientes características^{221,222}:

Grupo I (HOO) (está presente la enzima fructosa-1,6- difosfato aldolasa): no fermentan pentosas, no producen CO₂ a partir de glucosa ni gluconato.

Grupo II (HF) (están presentes ambas enzimas, la fructosa-1,6- difosfato aldolasa y fosfoacetolasa): fermentan pentosas, no producen CO₂ a partir de glucosa, pero si lo hacen a partir del gluconato.

Grupo III (HO) (está presente la enzima fosfoacetolasa y ausente la fructosa-1,6- difosfato): no fermentan pentosas, y producen CO₂ a partir de glucosa y gluconato.

- *Identificación de especie. Capacidad fermentativa de fuentes de carbono*

Se realizó el crecimiento de un cultivo fresco de 18 horas de cada cepa en caldo MRS, sin extracto de carne, y con los siguientes carbohidratos al 1%: arabinosa, cellobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manosa, melobiosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, sucrosa y trehalosa, y se adicionó el indicador Rojo fenol al 0,004%. Todos fueron incubados a 37° C durante 48 horas en microanaerobiosis y posteriormente se efectuó la lectura de los resultados en la que se observó la reacción positiva por el cambio de color de rojo a amarillo^{221,222}.

Identificación fenotípica de los aislamientos de lactobacilos por metodología automatizada (MALDI-TOF)

La diversidad bioquímica intraespecífica de los lactobacilos vaginales y en especial las especies estrechamente relacionadas dentro del complejo de *L. acidophilus* los caracteriza como bacterias difíciles de diferenciar por métodos fenotípicos basados únicamente en la capacidad fermentativa de fuentes de carbono. Por lo tanto las cepas se enviaron desde Santa Fe al Hospital de Clínicas (CABA) para completar y confirmar las identificaciones con metodología centrada en el perfil de proteínas mediante espectrometría de masa MALDI-TOF (Bruker BD Matrix assisted laser desorption ionization time of flight), utilizando una base de datos conteniendo más de 90 especies de lactobacilos. Se consideró un resultado confiable en las identificaciones de género y especie cuando al menos se obtuvieron los 2 mejores score ($\geq 1,70$) midiendo la misma especie²²³

Identificación genotípica de Lactobacilos

Microorganismos y condiciones de cultivo.

Las bacterias lácticas reaisladas y sembradas en la superficie de MRS-agar, e incubadas durante 48 hs a 37°C fueron enviadas desde Santa Fe al Centro de Referencia de lactobacilos (CERELA) San Miguel de Tucumán, y conservadas a 2-8°C hasta su procesamiento. Colonias aisladas se observaron macroscópicamente y se registraron sus características morfológicas. Luego se subcultivaron en MRS-caldo y se incubaron a 37°C, 24 hs, en condiciones de micro-aerofilia.

Las bacterias lácticas caracterizadas como bacilos Gram positivos, catalasa negativa, fueron conservadas en LEL (Leche extracto de levadura) adicionada de crioprotector (glicerol) a -20°C. Las bacterias se conservan luego de dos lavados con solución fisiológica estéril (por centrifugación a 5000 rpm durante diez minutos), y el pellet se resuspende en 1.5 ml de LEL + glicerol 2%.

Extracción de ADN cromosómico de bacterias lácticas (Pospiech y Neumann modificada. 1995)

Las células de un cultivo (5 ml) crecido durante 16 h a 37°C fueron centrifugadas durante 10 min a 10.000 rpm, lavadas con 500 µl de *buffer* Tris-EDTA (TE) y; resuspendidas en 850 µl de solución de lizozima (10 mg/ml *buffer* SET). Luego de incubarlas 2 h a 37 °C, se les adicionó 85 µl de SDS 10% y 20 µl de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó nuevamente por 2 h a 55 °C (mezclando periódicamente por inversión). Luego se agregó 335 µl de NaCl 5 M y 1,3 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente, mezclando el tubo frecuentemente por inversión. Se centrifugó por 10 min a 12.000 rpm y la fase acuosa (fase superior) se transfirió a otro tubo de centrifuga. Se precipitó el ADN con 1 volumen de alcohol isopropílico y se lo recuperó por centrifugación durante 3 min a 12.000 rpm. Se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70%, se centrifugó 3 min a 12.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El alcohol residual se dejó evaporar y se resuspendió el ADN en un volumen de 100-500 µl de *buffer* TE o H₂O mili-Q esterilizada^{224,225,226,227}.

Rep-PCR genomic fingerprinting

La mezcla de reacción para realizar las reacciones de PCR fue la siguiente:

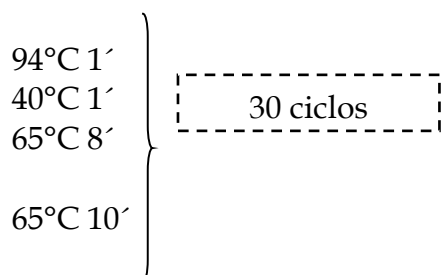
Mezcla de trabajo para una reacción PCR

Mezcla de Trabajo	Concentración final
H ₂ O	
dNTPs (5 mM)	0,5 mM c/u
MgCl ₂ (25 mM)	5 mM
ADN	1-10 ng/µl
Cebador (10 µM)	1 µM
<i>Buffer</i> (5 X)	1 X
<i>Taq</i> (o <i>Pfu</i>) DNA	2,0 U
Polimerasa	

Vf = 20 µL

Ciclo de Amplificación con el cebador GTG×5 (Gevers y col, 2001)²²⁴

94°C 5'



La región variable del gen que codifica el ARN ribosomal 16S, se amplificó empleando los primers MLB y PLB, generando un fragmento de amplificación de 500pb (Kullen y col, 2000)²²⁵. Las reacciones de amplificación se efectuaron en un termociclador Biorad MyCycler™. Por cada 50ul de reacción se incluyeron dNTP 0,2 Mm (Promega), 1Um de cada cebador, 1X de buffer para PCR (INBIO HIGHWAY S.A.) MgCl₂ 3Mm (INBIO HIGHWAY S.A.), ADN 1-10 ng/μl, 5 U de Taq polimerasa (INBIO HIGHWAY S.A.) y agua miliQ. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial 4 min a 94°C, 30 ciclos de 45 s a 94°C de desnaturalización, 45 s a 55 °C de pegado o *annealing*, 45 s a 72°C de elongación y 7 min de 72°C de extensión final.

Condiciones de electroforesis en geles de agarosa (1,5%): 80V 105 min. Las bandas de los amplicones se detectaron mediante el uso del colorante fluorescente GelRed™ (Biotium Inc.; Hayward, CA, Estados Unidos) (dilución 1/10.000)^{224,225,226,227}.

Para la identificación de especies, las secuencias de ADNr 16S se compararon considerando un porcentaje de identidad superior al 98%. Las alineaciones de la secuencia del gen ARNr se realizaron usando el método de alineamiento de secuencia múltiple y las consultas de identificación se cumplieron mediante una búsqueda BLAST en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>).

✓ **Estudio de las citologías cervicales: relación con contenidos vaginales y factores de riesgo**

En las pacientes que consintieron el estudio cito-oncológico de Papanicolau, además de la muestra de contenido vaginal se agregó un extendido con muestra proveniente de cepillado de endocérnix y zona de transformación. Este material se derivó al Laboratorio de Procesamiento de Papanicolau “Dr. Daniel Rocco” de la ciudad de Santa Fe. Los resultados de la citología fueron clasificados según Bethesda en: ASCUS (células escamosas atípicas de significado incierto), ASC-H (células escamosas atípicas que no pueden excluirse de una anormalidad intraepitelial escamosa de alto grado), AGC “células glandulares atípicas”, AIS “adenocarcinoma endocervical in situ”, L-SIL “lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (CIN 1)”, H-SIL “lesión escamosa intraepitelial de alto grado (CIN 2 y CIN 3)” y SCC “carcinoma escamoso (in situ o invasivo)”. Los resultados de la

citología se relacionaron con los resultados de contenido vaginal y con los siguientes factores de riesgo reconocidos de cáncer de cuello de útero: antecedentes de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS), antecedentes obstétricos (partos y abortos), parto en la adolescencia, hábito de fumar y susceptibilidad genética.

✓ **Métodos anticonceptivos**

Se incluyeron en el estudio los siguientes métodos anticonceptivos, utilizados sin interrupción durante seis meses y provistos por el Programa Nacional de Salud Sexual y Procreación Responsable (Ministerio de Salud de la Nación y según Guía Práctica para profesionales²²⁸). Todas las pacientes utilizaron durante seis meses el mismo tipo de anticonceptivo.

- ***Anticonceptivos orales combinados (ACO)***: monofásico con una concentración de 100 microgramos de levonorgestrel y 30 microgramos de etinilestradiol por 21 comprimidos. Las usuarias debían tomar uno por día, siempre en el mismo horario y desde el día uno del ciclo. Después descansaban 7 días, y reiniciaban el tratamiento con un nuevo envase en el octavo día, aunque aún durase el sangrado.

- ***Anticonceptivos hormonales combinados de aplicación inyectable (ACI)***: combinación de 5 mg de valerato de estradiol y 50 miligramos de enantato de noretisterona. Las usuarias debían inyectarse mensualmente entre el séptimo y décimo día del ciclo.

- ***Dispositivo intrauterino medicado con cobre (Cu)***: las mujeres que optaron por este método podían colocarse el DIU T Cu 380 en cualquier momento si existía una razonable certeza de que no estaba embarazada. Si bien se puede insertar en cualquier momento del ciclo, está recomendado hacerlo durante el sangrado menstrual. Es requisito indispensable un examen previo de la vagina y su contenido.

- ***Preservativo masculino***: de látex, clásicos, lisos y lubricados. Las mujeres que concurrían al centro de salud para retirar este método de barrera, de elección muy frecuente en parejas estables, recibía varias unidades y se reforzaban en cada consulta las recomendaciones del uso adecuado. Las voluntarias que aceptaron participar en el estudio se comprometían al uso constante durante los seis meses.

- ***Método del ritmo (RIT)***: las participantes que seleccionaron los métodos basados en el conocimiento de la fertilidad, recibieron toda la información sobre el método de ritmo. En la mayoría de los casos, concurrió la pareja y ambos fueron invitados para participar en el

estudio cuando mostraron convicción y voluntad de abstenerse del coito vaginal durante los días fértiles.

• **Doble protección, anticoncepción/barrera (ACO+PRE)**: este método fue recomendado a mujeres que manifestaban actividad sexual frecuente y sin pareja estable, en nuestro caso se trataba principalmente de adolescentes. Las que aceptaron participar del estudio se comprometieron a utilizar doble método durante los seis meses.

✓ **Análisis de los resultados**

- Para analizar los datos epidemiológicos obtenidos y caracterizar la población en estudio, se procedió a dividirla en tres grupos según se detalla a continuación: a) mujeres con pareja estable, b) mujeres con parejas ocasionales y c) mujeres sin pareja en la actualidad y en los últimos 6 meses.
- Para la clasificación de sintomáticas y asintomáticas: se consideraron sintomáticas las que manifestaron tres signos y/o síntomas.
- Considerando resultados del estudio de base (1° examen del CV) se procedió a evaluar la prevalencia de estados vaginales básicos (combinación del VN con el estado de RIV) y detección de levaduras y trichomonas, en la población integral estudiada.
- El algoritmo diagnóstico priorizo el EVB que se detectó en cada caso. Se analizaron las frecuencias relativas de EVBs en función del método anticonceptivo utilizado después de 3 y 6 meses.
- Se realizó distribución de frecuencias para variables cualitativas y cuantitativas. Se utilizó el programa EPI-INFO 6, versión 6.04, para el análisis de la influencia de los métodos contraceptivos sobre los estados vaginales básicos, utilizando la prueba de Chi-cuadrado, cálculo de Odds ratio y se aplicó la prueba de Fisher cuando las frecuencias lo requirieron. El nivel de significación adoptado fue de 5%
- Las frecuencias relativas de levaduras y TV asociadas a cada uno de los EVBs, también fue analizada en función de los métodos anticonceptivos.
- Los cambios de la MV del estudio basal y de los controles posteriores se evaluaron mediante la prueba de comparación de McNemar para cada método anticonceptivo.
- Las frecuencias relativas de levaduras y TV, asociadas a cada uno de los EVBs, también fueron analizada en función de los métodos anticonceptivos.

- Las diferentes especies de lactobacilos de contenidos vaginales con microbiota normal fue relacionada con los diferentes métodos anticonceptivos utilizando la prueba de Chi-cuadrado y calculo de Odds ratio como medida de asociación. y se aplicó la prueba de Fisher cuando las frecuencias lo requirieron. El nivel de significación adoptado fue de 5% ($p < 0,05$).
- El índice de kappa se aplicó en la evaluación de la comparación entre los métodos de identificación de lactobacilos. Clasifica de la siguiente manera: excelente (1,00 a 0,80), buena (0,79-0,60), moderada (0,59-0,40), justo (0,39-0,20), pobre (0,19 hasta 0,00) o en total desacuerdo ($< 0,00$).
- Se relacionó resultados de citología (PAP) con los estados vaginales básicos y los siguientes factores de riesgo seleccionados: 1) antecedentes de infecciones de Transmisión Sexual, 2) antecedentes obstétricos (partos y abortos), 3) parto en la adolescencia (mujer con un parto antes de los 20 años), 4) hábito de fumar (mujer que fumara 5 o más cigarrillos diarios) y susceptibilidad genética (mujeres con el antecedente de familiares de primera o segunda línea con diagnóstico de cáncer cervico-uterino).

RESULTADOS

➤ **Características de la población en estudio**

Se incluyeron en el estudio 215 mujeres, correspondientes 187 a la localidad de Sa Pereira y 28 a la localidad de San Mariano de la Provincia de Santa Fe.

Se registraron 11/215 (5,1 %) mujeres que ingresaron y se retiraron del estudio, quienes no concurrieron al control de los tres meses ni al de los 6 meses, por los motivos detallados a continuación: 3/215 (1,4%) por traslados a otras localidades, 3/215 (1,4%) por complicaciones de salud que requirieron derivación a Centros de mayor complejidad, 1/215 (0,5%) por embarazo y 4/215 (1,8%) que manifestaron haber aceptado efectuarse la lisis tubarica.

Asimismo, en el transcurso de tres años y medio, reingresaron al estudio después de seis meses sin anticoncepción, un total de 40 mujeres (16,3%); correspondientes 6/40 (15,0 %) y 34/40 (85,0 %) a las localidades de San Mariano y Sa Pereira respectivamente.

Con respecto a la concurrencia a los controles cabe mencionar que 187/215 (86,9%) asistieron al primer control a los tres meses y 178/215 (82,8 %) al segundo control a los seis meses de iniciado el método anticonceptivo.

Se utilizaron datos primarios, que se recavaron del cuestionario individual cumplimentado en el momento de la entrevista por parte del personal capacitado. En la Tabla 4 se muestran las características de la población en estudio, clasificada en tres grupos: 1) pareja estable (edad promedio de 32,1 años), 2) parejas ocasionales (edad promedio de 25,2 años) y grupo 3) sin pareja en los últimos seis meses (edad promedio de 26 años).

La edad promedio de inicio en la actividad sexual fue 16,1 años en el Grupo 1, 15,5 años en el Grupo 2 y 19 años en el Grupo 3. Las participantes del grupo 1 y grupo 2 refirieron un promedio de dos encuentros sexuales semanales. En relación al primer embarazo, la edad promedio fue 19,6 años en el Grupo 1 y 16,2 años en el Grupo 2.

Cabe señalar que en este análisis no fueron incluidas las pacientes que reingresaron al estudio.

Tabla 4: Características y antecedentes de participantes ingresantes en el estudio.

Características y antecedentes de las participantes ingresantes en el estudio <i>n = 175</i>	GRUPO 1 (pareja estable) n (%)	GRUPO 2 (parejas ocasionales) n (%)	GRUPO 3 (sin pareja en los últimos 6 meses) n (%)
Distribución			
	142 (81,1)	31(17,7)	2 (1,2)
Estado conyugal			
Soltera	12 (8,4)	20(64,6)	(2)100
Casada	104(73,2)	1(3,2)	-
Conviviente	24(17,0)	1(3,2)	-
Divorciada	2(1,4)	8(25,8)	-
Viuda	-	1(3,2)	-
Edad de inicio de la actividad sexual			
< 15 años		46 (26,3)	
15-19 años		111 (63,4)	
> 19 años		18(10,3)	
Número de embarazos			
Nulípara	22(15,5)	18(58,1)	1(50)
Un embarazo	40(28,2)	8(25,8)	1(50)
Dos embarazos	43(30,3)	1(3,2)	-
Mas de dos embarazos	37(26,0)	4(12,9)	-
Abortos Espontáneos			
Un aborto	14(9,8)	2(6,4)	-
Dos abortos	5(3,5)	-	-
Mas de dos abortos	-	1(3,2)	-
Abortos inducidos por complicaciones irreversibles			
Un aborto	1(0,7)	-	-
Dos abortos	-	-	-
Más de dos abortos	-	-	-
Antecedentes de infección en la paciente y/o en la pareja			
Gonococia	9(6,3)	2(6,4)	-
Sífilis	-	-	-
Chancro blando	-	-	-
Linfogranuloma venéreo	-	-	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	5(3,5)	-	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	-	-
Herpes virus	-	-	-
Hepatitis B C D	-	-	-
Papiloma virus humano (HPV)	2(1,4)	1(3,2)	-
Citomegalovirus	-	-	-
Virus de Inmunodeficiencia humano (VIH)	-	-	-
Tricomoniasis	10(7,0)	2(6,4)	-

Antecedentes de enfermedades preneoplásicas y neoplásicas			
Aparato genital	14(9,8)	4(12,9)	-
Otra localización	5(3,5)	-	-
Enfermedad de base			
Diabetes	-	1(3,2)	
Incontinencia urinaria o fecal por Malformaciones congénitas	2(1,4)	-	-
Deficiencia inmunológica	-	-	-
Estudios realizados en los últimos seis meses (relacionados con el aparato genital)			
PAP	5(3,5)	4(12,9)	-
Colposcopia	1(0,7)	-	-
Ecografía	2(1,4)	1(3,2)	-
Otros	-	-	-
Fumadora			
	45(31,7)	18(58,0)	-

➤ **Caracterización de las pacientes según la sintomatología y su relación con los EVBs.**

Para la clasificación de las pacientes según la sintomatología se consideró como sintomáticas aquellas pacientes que manifestaron tres o más signos y/o síntomas. De este manera en el estudio de base (cuando concurren al Centro de Salud por consejería, elección del método anticonceptivo y consintieron participar del estudio) se obtuvo la siguiente distribución 78/215 (36,2 %) sintomáticas y 137/215 (63,7 %) asintomáticas. En la Tabla 5 se describe la distribución de las frecuencias de signos y síntomas manifestados por las participantes durante el cuestionario en relación a los EVBs al inicio del estudio.

Considerando únicamente los cinco EVBs, independiente de los patógenos presentes, la presencia de signos y síntomas fue mayor en los EVB II ($p = 0,0007$) y EVB V ($p < 0,0001$) en forma estadísticamente significativa con respecto a los EVB I, III y IV. Cuando se analizó la presencia de levaduras y TV, se detectaron las siguientes asociaciones positivas: levaduras con prurito ($p < 0,0001$); TV con aumento de flujo ($p < 0,0001$), dispareunia ($p = 0,03$), metrorragia ($p = 0,01$), ardor ($p = 0,004$), dolor pélvico ($p < 0,0001$) y disuria ($p = 0,001$). La baja prevalencia de otros patógenos no justificó su análisis.

Tabla 5: Distribución de las frecuencias de signos y síntomas y relación con EVB detectados al inicio del estudio.

EVB	TOTAL Sintomáticas (n)	DISTRIBUCIÓN DE SIGNOS Y SÍNTOMAS (n)													
		AF	SIN	DIP	VUL	PRU	MET	ARD	DPL	DIS	POL	TUM	TGE	LGE	L M
I	2	1	-	1	2	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-
I+Lev	4	3	-	-	2	3	-	-	-	1	-	-	-	-	
II	3	3	-	-	2	3	-	1	1	3	1	-	-	-	
II+Lev	17	8	2	5	4	15	-	15	5	12	1	-	-	-	
II+TV	2	2	1	1	-	1	2	2	1	-	-	-	-	-	
II+Lev+TV	3	3	2	2	-	2	-	3	3	2	-	-	-	-	
II+Chlamydia	1	1	1	1	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	
III+Lev	3	3	-	1	-	2	-	2	1	2	-	-	-	-	
IV	9	8	1	7	1	5	1	4	5	3	2	-	-	-	
IV+Lev	7	6	1	2	3	6	1	4	3	5	1	-	-	-	
V	2	2	-	1	-	1	-	-	1	1	-	-	-	-	
V+Lev	4	3	-	1	3	4	-	2	-	1	-	-	-	-	
V+TV	17	17	3	11	1	7	5	14	15	14	6	-	-	-	
V+Lev+TV	2	2	1	1	1	2	-	2	2	2	-	-	-	-	
V+Streptococcus grupo B	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	
V+Chlamydia	1	1	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
Total	78	64	13	65	20	51	11	52	39	48	12	-	-	-	

AF: aumento de flujo, SIN: sinusorragia, DIP: dispareunia, VUL: vulvonidia, PRU: prurito, MET: metrorragia, ARD: ardor, DPL: dolor pélvico, DIS: disuria, POL: polaquiuria, TUM: tumoración inguinal, TGE: tumoración en genitales externos, LGE: lesiones en genitales externos, LM lesiones en otras mucosas., Lev: levaduras – TV: trichomonas.

En la Tabla 6 se observan las prevalencias de los EVB y su asociación con los distintos patógenos en las pacientes asintomáticas y sintomáticas. En las mujeres asintomáticas se observó mayor prevalencia del EVB I respecto de las sintomáticas, lo que representó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). La prevalencia del EVB IV fue similar en ambos grupos. Las prevalencias de los EVB II y V fueron mayores en las pacientes sintomáticas que en las asintomáticas, lo que representó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (tabla 1)

Tabla 6: Prevalencias de los estados vaginales básicos (EVB) y su asociación con los distintos patógenos en las pacientes asintomáticas y sintomáticas

EVB	Asintomaticas		Sintomaticas		P
	(n=137)		(n=78)		
	n	%	n	%	
I	63	46,0	2	2,6	<0,0001
I+Lev	13	9,5	4	5,1	
II	13	9,5	3	3,8	<0,0001
II+Lev	5	3,6	17	21,8	
II+TV	0	-	2	2,6	
II+Lev+TV	1	0,7	3	3,8	
II+Chlamydia	0	-	1	1,3	
III	5	3,6	0	-	0,46
III+Lev	0	-	2	2,6	
III+Lev+TV	0	-	1	1,3	
IV	29	21,2	9	11,5	0,64
IV+Lev	1	0,7	7	9,0	
V	6	4,4	2	2,6	<0,0001
V+Lev	0	-	4	5,1	
V+Tv	0	-	17	21,8	
V+Lev+TV	1	0,7	2	2,6	
V+Streptococcus agalactiae	0	-	1	1,3	
V+Chlamydia	0	-	1	1,3	
Total	137	100	78	100	

Lev: levaduras – TV: trichomonas.

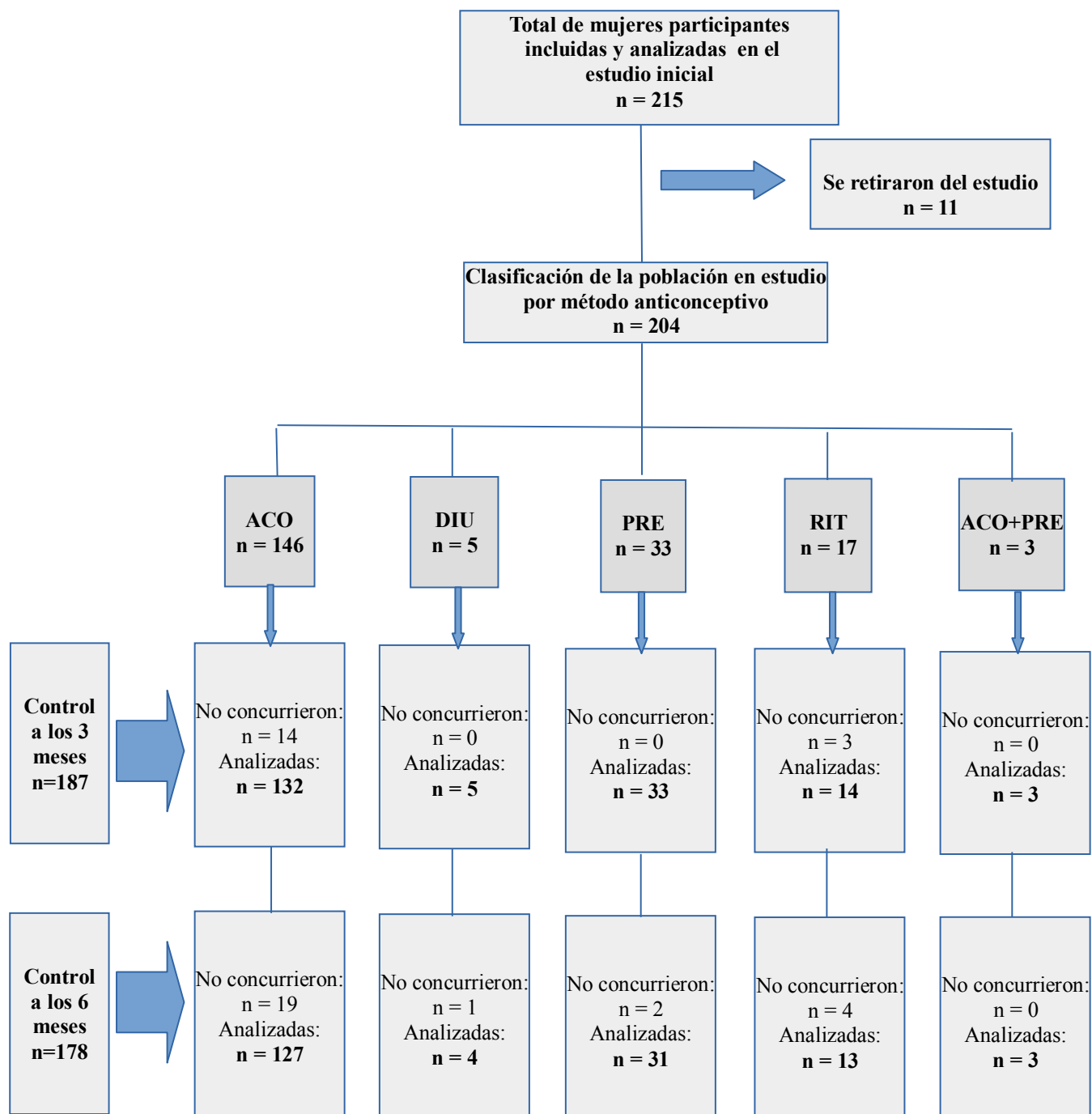
➤ **Prevalencia de EVBs previos a la anticoncepción y detección de levaduras y trichomonas, en la población total estudiada.**

De las 215 mujeres incorporadas al estudio, se detectó en la primera evaluación, previo al inicio de la utilización del método anticonceptivo elegido: 82 (38,1 %) correspondientes al EVB I de microbiota normal, 45 (21 %) al II de microbiota normal con reacción inflamatoria vaginal, 8 (3,7 %) al III de microbiota intermedia, 46 (21,4 %) al IV de vaginosis bacteriana y 34 (15,8 %) al V de vaginitis microbiana inespecífica. El 15,8% de EVB V incluyó; 11,1 % de vaginitis convencionales por levaduras y trichomonas y 4,7 % de vaginitis inespecífica que se subclasificaron en patrones microscópicos con VN 4-6 (2,8 %) que correspondieron a ausencia de lactobacilos con presencia de morfotipos comensales aeróbicos (*Streptococcus agalactiae*) y a disminución de lactobacilos con incremento de morfotipos compatibles con anaerobios (microbiota intermedia) y con VN 7-10 (1,9 %) correspondientes a predominio de morfotipos compatibles con anaerobios

(microbiota alterada) (Tabla 7). Cabe acalrar que uno de los seis contenidos con VN 4-6 se asoció a la presencia significativa en el cultivo de *Streptococcus agalactiae*.

La distribución y seguimiento de las pacientes, de acuerdo al método anticonceptivo, al inicio del estudio y a los 3 y 6 meses se muestra en la Figura 12.

Figura 12 Distribución y seguimiento de la población integral estudiada según método anticonceptivo



ACO: anticonceptivo oral (levonorgestrel-Etinilestradiol) - DIU: dispositivo intrauterino - PRE: preservativo - RIT: método del ritmo
- ACO+PRE: doble protección simultánea

En la Tabla 7 se presenta la distribución de los cinco EVBs correspondientes al examen inicial del total de la población estudiada, incluyéndose la detección de levaduras y trichomonas en función de cada uno de los EVBs.

La RIV estuvo presente en 79 (36,7 %) del total de las mujeres analizadas.

La frecuencia de detección global de levaduras fue de 61/215 (28,4 %). En los EVBs con VN de 4 a 10, se observó una menor proporción de levaduras en forma estadísticamente significativa con respecto a EVB con VN de 0 a 3 ($p = 0,04$) (Tabla 1). De los 61 casos de levaduras se detectó RIV en 26 (42,6%) como único patógeno y en 7 (11,5%) asociadas a trichomonas.

Se reveló la presencia de trichomonas en 27/215 (12,6 %) de las mujeres estudiadas. En la franja de EVB con VN 4 a 10, la presencia de trichomonas fue mayor en forma estadísticamente significativa con respecto a EVB con VN 0 a 3 ($p < 0,0001$). De los 27 casos con trichomonas, 26 (96,3 %) se asociaron a RIV. Cabe señalar que se detectaron 23 CV con trichomonas por examen en fresco y coloraciones, y que se incrementaron a 27 CV con el cultivo.

Tabla 7: Prevalencia de “Estados vaginales básicos” y detección de levaduras y trichomonas, en la población total estudiada previo a la anticoncepción.

EVBS	n	Mb		Mb+Lev		Mb+TV		Mb+Lev+TV	
		n	%	n	%	n	%	n	%
I Microbiota normal	82	65	30,2	17	7,9	-	-	-	-
II Microbiota normal+RIV	45	17	7,9	22	10,2	2	0,9	4	1,9
III Microbiota intermedia	8	5	2,3	2	0,9	-	-	1	0,5
IV Vaginosis bacteriana	46	38	17,7	8	3,7	-	-	-	-
V Vaginitis microbiana inespecífica	34	10	4,7	4	1,9	17	7,9	3	1,4
Total	215	135	62,8	53	24,6	19	8,8	8	3,8

EVBS: Estados Vaginales Básicos Mb: microbiota bacteriana - Le: levaduras - TV: trichomonas - - RIV: reacción inflamatoria vaginal

➤ **Influencia de la Anticoncepción**

✓ **Frecuencias relativas de EVBs, detectadas a los tres y seis meses, en función del método anticonceptivo.**

En la Tabla 8 y 9 se presentan los resultados de frecuencias de EVBs a los tres y seis meses de utilización ininterrumpida de los métodos anticonceptivos incluidos en este estudio, más comúnmente utilizados (ACO, PRE y RIT). Los anticonceptivos hormonales inyectables no fueron elegidos por las participantes.

A los tres meses:

- ACO aumentó la frecuencia de microbiota normal (OR 2,16 – $p=0,02$) y redujo el riesgo de VB (OR 0,35 – $p=0,005$). La ingesta de ACO en este estudio mostró protección del estado vaginal (Tabla 8).
- PRE disminuyó la frecuencia de microbiota normal (OR 0,22 – $p=0,001$), incrementó el riesgo de VB (OR 3,25 – $p=0,004$) y estados de vaginitis microbiana inespecífica (OR 5,32 – $p=0,01$) (Tabla 8).

En relación al DIU y a la doble protección simultaneas ACO+PRE, 5 y 3 participantes respectivamente fueron evaluadas al inicio y a los tres meses. La baja frecuencia de utilización de dichos métodos en este estudio no permitió establecer una asociación con los EVB mediante sustento estadístico.

A los seis meses:

- ACO aumentó la frecuencia de microbiota normal (OR 8,12 – $p<0,0001$), disminuyó los estados de vaginitis microbiana (OR 0,12 – $p=0,005$) y redujo el riesgo de VB (OR 0,18 – $p=0,001$). La ingesta de ACO mostró protección del estado vaginal (Tabla 9)
- PRE redujo la frecuencia de microbiota normal (OR 0,08 – $p<0,0001$) e incrementó el riesgo de estados de microbiota normal + reacción inflamatoria vaginal (OR 2,39 – $p=0,02$), de VB (OR 3,5 – $p=0,03$) y de VMI (OR 22,4 – $p<0,0001$). (Tabla 9)

En relación al DIU y a la doble protección simultaneas ACO+PRE, 4 y 3 participantes respectivamente fueron evaluadas al inicio y a los seis meses. La baja frecuencia de utilización de dichos métodos en este estudio no permitió establecer una asociación con los EVB mediante sustento estadístico

Tabla 8: Asociación de Estados vaginales básicos con los métodos anticonceptivos después de tres meses de utilización.

ESTADOS VAGINALES BASICOS		METODO ANTICONCEPTIVO		
		ACO (n)p OR(95%IC)	PRE (n)p OR(95%IC)	RIT (n)p OR(95%IC)
I	Microbiota normal	59(0,02) 2,16 (1,03-4,54)	5(0,001) 0,22 (0,07-0,64)	8(0,16) 2,16 (0,64-7,41)
II	Microbiota normal+RIV	42(0,90) 1,04 (0,50-2,18)	12(0,80) 1,10 (0,46-2,62)	2(0,19) 0,34 (0,05-1,68)
III	Microbiota intermedia	8(0,19) 3,48 (0,43-76)	-	-
IV	Vaginosis bacteriana	18(0,005) 0,35 (0,15-0,80)	11(0,004) 3,25 (1,30-8,12)	4(0,25) 1,83 (0,45-6,95)
V	Vaginitis microbiana inespecífica	5(0,13) 0,39 (0,09-1,65)	5(0,01) 5,32 (1,23-23,1)	-
TOTAL 179		132	33	14

ACO: anticonceptivo oral (levonorgestrel-Etinilestradiol) – PRE: preservativo – RIT: método del ritmo –

Tabla 9: Asociación de Estados vaginales básicos con métodos anticonceptivos después de seis meses de utilización.

ESTADOS VAGINALES BASICOS		METODO ANTICONCEPTIVO		
		ACO (n)p OR(95%IC)	PRE (n)p OR(95%IC)	RIT (n)p OR(95%IC)
I	Microbiota normal	82(p<0,0001) 8,12 (3,64-18,4)	3(p<0,0001) 0,08 (0,02-0,29)	8(0,37) 1,68 (0,47-6,17)
II	Microbiota normal+RIV	38(0,48) 0,79 (0,39-1,60)	15(0,02) 2,39 (1,01-5,62)	2(0,16) 0,37 (0,06-1,87)
III	Microbiota intermedia	-	-	-
IV	Vaginosis bacteriana	5(0,001) 0,18 (0,05-0,61)	6(0,03) 3,50 (1,02-11,7)	2(0,31) 2,08 (0,0-11,6)
V	Vaginitis microbiana inespecífica	2(0,005) 0,12 (0,02-0,67)	7(p<0,0001) 22,4 (3,92-167)	1 No se evalúa
TOTAL 171		127	31	13

ACO: anticonceptivo oral (levonorgestrel-Etinilestradiol) – PRE: preservativo – RIT: método del ritmo –

✓ **Análisis prospectivo de la microbiota vaginal en función de los métodos anticonceptivos. Reconocimiento de los procesos de conversión.**

○ **Reconocimiento de procesos de conversión a los tres meses.**

Para el análisis de los procesos de conversión se consideraron los EVBs al inicio y a los tres meses de aquellas pacientes que concurrieron al control de los tres meses

Después de tres meses de utilización ininterrumpida de los métodos anticonceptivos incluidos en este estudio, considerando únicamente los cambios de la microbiota vaginal, independientemente de la variación de la RIV, se observó en el grupo mayoritario ACO (n= 132) que 77 CV conservaron el EVB I y II de microbiota vaginal normal, 5 CV modificaron a EVB III de microbiota intermedia, y de 50 CV con EVBs alterados al inicio de ACO, 24 remitieron a EVB I y II de microbiota vaginal normal. Estos cambios refirieron asociación estadística significativa ($p < 0,0001$) (Tabla 10 y 12) (Figura 13).

En el grupo de las 33 mujeres que optaron por PRE, se incrementó la RIV en 7 (21,2 %) de los CV (conversión a EVBs II y V) (Tabla 10 y 13) (Figura 14).

Trece pacientes de las 14 que seleccionaron el ritmo como método anticonceptivo conservaron el EVB inicial (Tabla 10 y 14) (Figura 15).

De las 5 mujeres que portaban DIU, 3 conservaron sus EVBs iniciales (2 EVB I y 1 EVB II), 1 modificó su EVB I normal a EVB III de microbiota intermedia y 1 a EVB de vaginosis bacteriana.

De las tres pacientes que decidieron por ACO + PRE; 1 modificó su EVB I a EVB II y 2 mantuvieron el EVB inicial.

○ **Reconocimiento de procesos de conversión a los seis meses.**

Para el análisis de los procesos de conversión se consideraron los EVBs al inicio y a los seis meses de aquellas pacientes que concurrieron al control de los seis meses

Después de seis meses de utilización ininterrumpida de los métodos anticonceptivos incluidos en este estudio, considerando únicamente los cambios de la microbiota vaginal, independientemente de la variación de la RIV, se observó en el grupo mayoritario ACO (n= 127) que 83 CV conservaron el EVB I y II de microbiota vaginal normal, 1 CV modificó a EVB IV de vaginosis bacteriana, y de 43 CV con EVBs alterados al inicio de ACO, 37 remitieron a EVB I y II de microbiota vaginal normal. Estos cambios refirieron asociación estadística significativa ($p < 0,0001$) (Tabla 11 y 12) (Figura 13).

En las 31 mujeres que optaron por PRE, se incrementó la RIV en 10 (32,3 %) de los CV (conversión a EVBs II y V) ($p=0,01$) (Tabla 11 y 13) (Figura 14)

Doce pacientes de las 13 que seleccionaron el ritmo como método anticonceptivo conservaron el EVB inicial (Tabla 11 y 14) (Figura 15).

De las 4 mujeres que portaban DIU, 3 modificaron su EVB I normal a EVB de vaginosis bacteriana. En las tres pacientes que decidieron por ACO + PRE; se mantuvo el EVB inicial.

En relación a las mujeres que en el estudio de base presentaron EVB IV (vaginosis bacteriana), solo fueron tratadas con metronidazol las sintomáticas y se obtuvieron los siguientes resultados:

- A los tres meses, en el grupo de ACO + tratamiento fueron incluidas 7/25 pacientes de las cuales 2/7 (28,6%) corrigieron a EVB I.
- A los seis meses, en el grupo de ACO + tratamiento fueron incluidas 8/23 pacientes, de las cuales 5/8 (62,5 %) convirtieron a estados de microbiota normal (EVB I y II).

Mientras que las pacientes asintomáticas que sólo recibieron ACO, a los 3 meses fueron incluidas 18/25, de las cuales 8/18 (44,4%) convirtieron a estados de microbiota normal ($p=0,40$). Las pacientes asintomáticas que sólo recibieron ACO, a los 6 meses fueron incluidas 15/23 de las cuales 13/15 (86,7%) convirtieron a estados de microbiota normal ($p= 0.21$).

Tabla 10: Distribución de los EVB en el estudio inicial y a los tres meses de utilización del método anticonceptivo.

EVB	Métodos anticonceptivos					
	ACO		PRE		RIT	
	Inicio	tres meses	Inicio	tres meses	Inicio	tres meses
	n	EVB (n)	n	EVB (n)	n	EVB(n)
I. Microbiota normal	55	43(I) - 12(II)	8	5(I) -3(II)	7	7(I)
II Microbiota normal + RIV	27	3(I) - 19(II) - 5(III)	7	7(II)	3	1(I) - 2(II)
III Microbiota intermedia	6	*2(I) - 1(II) - 3(III)	1	1(II)	-	-
IV Vaginosis bacteriana	25	*8(I) - 2(II) -15(IV)	13	1(II) -10(IV) -2(V)	4	4(IV)
V: Vaginitis microbiana	19	*3(I) - 8(II)-3(IV)-5(V)	4	1(IV) -3(V)	-	-
Total	132	-	33	-	14	-

EVB: estado vaginal básico – **RIV:** reaccion inflamatoria vaginal - **ACO:** anticonceptivo oral (levonorgestrel-Etinilestradiol) – **PRE:** preservativo – **RIT:** método del ritmo - * Conversión a EVB I y II de MN en el grupo ACO

Tabla 11: Distribución de los EVB en el estudio inicial y a los seis meses de utilización del método anticonceptivo

EVB	Métodos anticonceptivos					
	ACO		PRE		RIT	
	Inicio	seis meses	Inicio	seis meses	Inicio	seis meses
	n	EVB (n)	n	EVB (n)	n	EVB(n)
I. Microbiota normal	54	43(I) -10(II) - 1(IV)	8	2 (I) - 5(II)-1(V)	7	7 (I)
II Microbiota normal + RIV	30	14(I) -16(II)	5	5(II)	3	1(I) - 2(II)
III Microbiota intermedia	4	*3(I)- 1(II)	2	2 (II)	-	-
IV Vaginosis bacteriana	23	*13(I)-5(II)-4(IV)-1(V)	14	3(II)-5(IV)-6(V)	2	2(IV)
V: Vaginitis microbiana	16	*9(I)-6(II) - 1(V)	2	1(I) -1(IV)	1	1(V)
Total	127	-	31	-	13	-

EVB: estado vaginal básico – **RIV:** reacción inflamatoria vaginal - **ACO:** anticonceptivo oral (levonorgestrel-Etinilestradiol)-
PRE: preservativo – **RIT:** método del ritmo - * Conversión a EVB I y II de MN en el grupo ACO

Para una mejor visualización de los procesos de conversión se graficaron los EVBs al inicio, a los tres y a los seis meses para cada método anticonceptivo (Figuras 13, 14 y 15).

Figura 13 Conversión de EVBs en el grupo mayoritario de mujeres con **anticoncepción hormonal (ACO)**

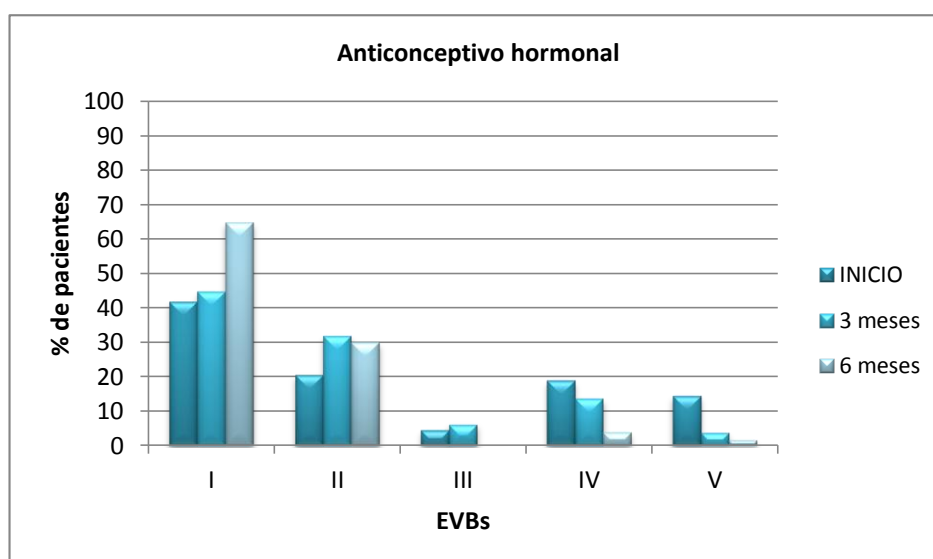


Tabla 12: Frecuencia de EVBs en el inicio, a los tres y seis meses de anticoncepción hormonal

EVB	Inicio		3 meses		6 meses	
	n	%	n	%	n	%
I	55	41,7	59	44,7	82	64,6
II	27	20,5	42	31,8	38	29,9
III	6	4,5	8	6,1	0	0
IV	25	18,9	18	13,6	5	3,9
V	19	14,4	5	3,8	2	1,6
total	132	100	132	100	127	100

Figura 14 Conversión de EVBs en el grupo de mujeres que optaron por *preservativos (PRE)*

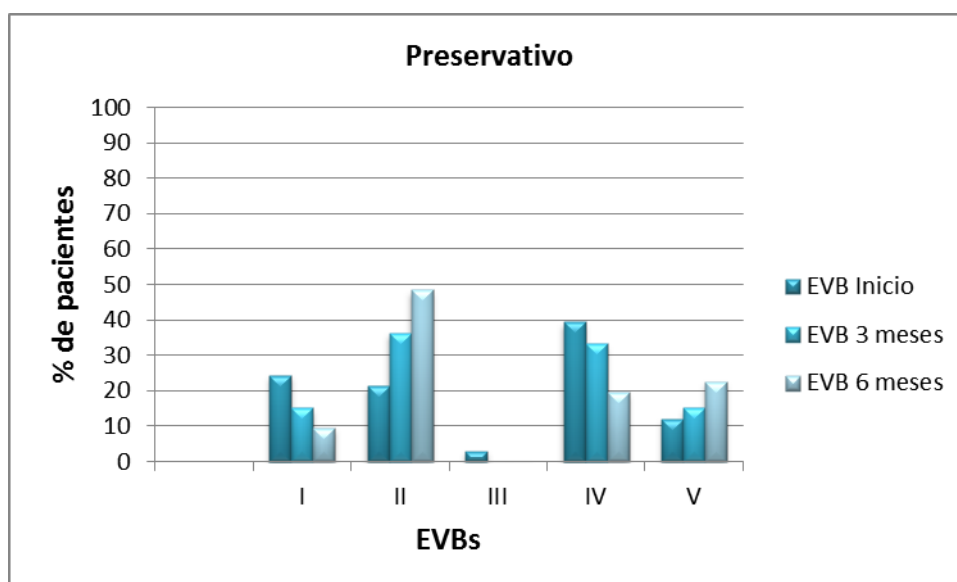


Tabla 13: Frecuencia de EVBs en el inicio, a los tres y seis meses de anticoncepción de barrera (preservativo)

EVB	Inicio		3 meses		6 meses	
	n	%	n	%	n	%
I	8	24,3	5	15,2	3	9,6
II	7	21,2	12	36,3	15	48,4
III	1	3,0	0	0	0	0
IV	13	39,4	11	33,3	6	19,4
V	4	12,1	5	15,2	7	22,6
total	33	100	33	100	31	100

Figura 15 Conversión de EVBs en el grupo de mujeres que optaron por el *método de Ritmo (RIT)*

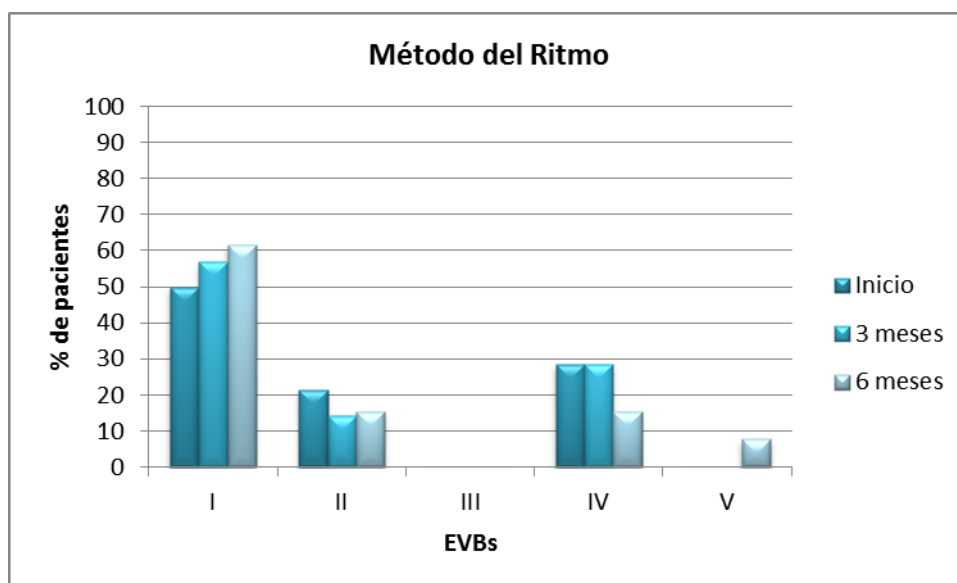


Tabla 14: Frecuencia de EVBs en el inicio, a los tres y seis meses de anticoncepción con método del ritmo.

EVB	Inicio		3 meses		6 meses	
	n	%	n	%	n	%
I	7	50	8	57,1	8	61,5
II	3	21,4	2	14,3	2	15,4
III	0	0	0	0	0	0
IV	4	28,6	4	28,6	2	15,4
V	0	0	0	0	1	7,7
total	14	100	14	100	13	100

➤ **Relación del método anticonceptivo con presencia de levaduras. Variación de los Estados vaginales básicos.**

En el grupo de participantes que iniciaron el estudio y cumplieron estrictamente con los controles posteriores se realizó una evaluación que incluyó: presencia y distribución por EVB de las levaduras, variaciones en los CV según el método anticonceptivo a los tres y seis meses, identificación de nuevas portadoras y efectividad de los tratamientos. Cabe señalar que se les prescribió tratamiento antimicótico únicamente a las pacientes sintomáticas. Como se observa en la Tabla 15, en el grupo mayoritario ACO, en las pacientes que ingresaron y cumplieron con el primer control a los tres meses, se detectaron 43 CV con levaduras al inicio del método, 8 recibieron tratamiento, de los cuales 2 no fueron efectivos. A los tres meses se detectaron 48 CV con levaduras, correspondiendo 21

a CV que resultaron negativos al inicio, de los cuales 11 (52,4 %) se asociaron a EVB I de microbiota normal y 10 (47,6%) a EVB II de microbiota normal con reacción inflamatoria vaginal. Este incremento en el número de pacientes con CV con levaduras, resultó estadísticamente significativo ($p < 0,0001$).

En el grupo PRE se detectaron al inicio y a los tres meses 12 y 6 CV con levaduras respectivamente, correspondiendo uno de ellos a un CV que resultó negativo al inicio. Tres pacientes recibieron tratamiento que resultó efectivo (Tabla 15).

En el grupo ACO que ingresaron al estudio y cumplieron el segundo control a los 6 meses se detectaron 32 CV con levaduras al inicio y 5 pacientes sintomáticas recibieron tratamiento, que resultó efectivo. A los seis meses se detectaron 27 CV con levaduras, correspondiendo 11 a CV que resultaron negativos al inicio, de los cuales 5 (45,4 %) se asociaron a EVB I de microbiota normal y 6 (54,5 %) a EVB II de microbiota normal con reacción inflamatoria vaginal (Tabla 16). Este incremento en el número de pacientes con CV con levaduras, resultó estadísticamente significativo ($p < 0,0001$).

En el grupo PRE se detectaron al inicio y a los 6 meses 9 y 6 CV con levaduras respectivamente, correspondiendo 3 a CV que resultaron negativos al inicio. Una paciente recibió tratamiento que no fue efectivo (Tabla 16):

Con respecto a la identificación de las levaduras en los CV, cabe señalar que la especie fue coincidente en el inicio y en los controles posteriores y se puede mencionar lo siguiente:

- En el estudio de inicio: se recuperaron 62 aislamientos correspondieron al género *Candida*, 59 resultaron complejo *Candida albicans* recuperadas como única especie, 1 fue confirmada como *Candida krusei* y en un CV se asoció *C. albicans* a otra especie que no pudo ser identificada.
- A los tres meses: se recuperaron 59 aislamientos, 58/59 correspondieron a complejo *Candida albicans* y una no se pudo identificar a nivel de especie.
- A los seis meses: se recuperaron 37 aislamientos 36/37 correspondieron a complejo *Candida albicans* y una no se pudo identificar a nivel de especie.

Tabla 15: Distribución de CVs con levaduras según EVB para los distintos métodos anticonceptivos en el estudio inicial y a los tres meses

Método anticonceptivo		Inicio del estudio					A los tres meses				
		Estado Vaginal Básico (n)					Estado Vaginal Básico (n)				
		I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
ACO	Concurrentes a los 3 meses	15	18	2	3	5	8	13	2	2	2
	Tratamiento	-	5	1	-	2	-	-	1*	-	1*
	Portadoras nuevas	-	-	-	-	-	11	10	-	-	-
DIU	Concurrentes a los 3 meses	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
	Tratamiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Portadoras nuevas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRE	Concurrentes a los 3 meses	-	4	2	4	2	-	3	-	1	2
	Tratamiento	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-
	Portadoras nuevas	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
RIT	Concurrentes a los 3 meses	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-
	Tratamiento	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	Portadoras nuevas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACO+PRE	Concurrentes a los 3 meses	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
	Tratamiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Portadoras nuevas	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-

ACO: anticonceptivo oral (levonorgestrel-Etinilestradiol) - DIU: dispositivo intrauterino - PRE: preservativo - RIT: método del ritmo - ACO+PRE: doble protección simultánea - * Fracaso de tratamiento.

Tabla 16: Distribución de CVs con levaduras según EVB para los distintos métodos anticonceptivos en el estudio inicial y a los seis meses

Método anticonceptivo		Inicio del estudio					A los seis meses				
		Estado Vaginal Básico (n)					Estado Vaginal Básico (n)				
		I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
ACO	Concurrentes a los 6 meses	11	16	-	3	2	7	9	-	-	-
	Tratamiento	1	4	-	-	-	-	-	-	-	
	Portadoras nuevas	-	-	-	-	-	5	6	-	-	
DIU	Concurrentes a los 6 meses	-	1	-	-	-	-	1	-	-	
	Tratamiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Portadoras nuevas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PRE	Concurrentes a los 6 meses	-	3	1	4	1	-	1	-	1	
	Tratamiento	-	-	-	-	1	-	-	-	1*	
	Portadoras nuevas	-	-	-	-	-	-	3	-	-	
RIT	Concurrentes a los 6 meses	2	1	-	-	-	2	-	-	-	
	Tratamiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Portadoras nuevas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ACO+PRE	Concurrentes a los 6 meses	-	1	-	-	-	-	1	-	-	
	Tratamiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Portadoras nuevas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

ACO: anticonceptivo oral (levonorgestrel-Etinilestradiol) - DIU: dispositivo intrauterino - PRE: preservativo - RIT: método del ritmo - ACO+PRE: doble protección simultánea - * Fracaso de tratamiento.

➤ *Trichomonas vaginalis* en los contenidos vaginales. Variación de EVBs

Con respecto al hallazgo de trichomonas, al inicio del estudio se detectaron en 27/215 (12,6%) de los CV con los siguientes EVBs: II (6), III (1) y V (20).

En la Tabla 17 se muestra la distribución inicial de los CV con *Trichomonas vaginalis* y la variación de los EVBs a los 3 y 6 meses, luego del tratamiento con metronidazol 1.000 mg día durante 7 días. En una paciente persistió el parásito dado que la pareja se resistió al tratamiento.

Tabla 17 Distribución de CV con trichomonas según el EVB para los distintos métodos anticonceptivos en el estudio inicial y en los controles de 3 y 6 meses.

Método anticonceptivo	Estudio inicial (n)					A los tres meses (n)					A los seis meses (n)				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
ACO	-	6	-	-	18	5	7	-	1	2 (1/2*)	10	6			1 (1/1*)
						No concurren: 9					No concurren: 7 pacientes				
DIU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRE	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
						No concurren: 1									
RIT	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
						No concurren: 2					No concurren: 2				
ACO+PRE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ACO: anticonceptivo oral (levonorgestrel-Etinilestradiol) - DIU: dispositivo intrauterino - PRE: preservativo - RIT: método del ritmo - ACO+PRE: doble protección simultánea * Persistencia del parásito en la misma paciente, la pareja se resistió al tratamiento.

Los 2 CV que pertenecían a mujeres que solicitaron consejería por RIT no se pudieron evaluar a los tres y a los seis meses porque las pacientes no concurren a los controles. En ambas pacientes se detectó el parásito en el EVB V y en una de ellas asociado a células atípicas, resultado que determinó la decisión médica de derivación a un centro de mayor complejidad, y mediante los estudios correspondientes se diagnosticó cáncer de cuello uterino.

➤ **Distribución de especies de lactobacilos. Caracterización genotípica.**

Comparación y validación de la caracterización fenotípica. Coeficiente Kappa.

Se tomaron al azar 84 aislamientos de lactobacilos provenientes de 84 contenidos vaginales obtenidos tanto de las pacientes que cumplieron en forma completa con los controles (inicio-3 meses-6 meses), como de quienes lo hicieron parcialmente (inicio-3 meses e inicio-6 meses). Estos aislamientos fueron identificados fenotípicamente (pruebas bioquímicas y MALDI-TOF) y comparados con la identificación genómica, mediante Rep-PCR genomic fingerprinting utilizando el cebador (GTG) 5 ((GTG) 5-PCR), la cual es una

técnica que resulta útil para la diferenciación de una amplia gama de lactobacilos a nivel de especie, subespecie y potencialmente a nivel de cepa^{224, 225}. Además, la amplificación del gen 16S ARNr que se suele aplicar para estudios filogenéticos, dado que su secuencia está altamente conservada entre las distintas especies, se utilizó para la identificación de los aislados. La espectrometría de masa MALDI-TOF, mostró resultados concordantes en el 100% de los aislados, con un coeficiente de correlación de concordancia Kappa de 1,00 (1,00 a 0,80 excelente grado de concordancia) (Tabla 18). De estos aislamientos, 33 (39,3%) fueron identificados como *L. gasseri*, 25 (29,8%) como *L. crispatus*, 15 (17,8%) como *L. jensenii*, 10 (11,9%) como *L. murinus* y 1(1,2%) como *L. johnsonii*. La Figura 16 muestra los diferentes biotipos de las cepas obtenidas durante la identificación de lactobacilos mediante ensayos de rep-PCR. Se indican los patrones de todos los biotipos, aunque no fueron las especies dominantes en el estudio. Se identificó un representante de cada biotipo mediante secuenciación del gen 16S rRNA parcial.

Considerando que a 84 de los aislamientos de lactobacilos, obtenidos al azar, se les realizó la identificación genómica a nivel de especie mediante la secuenciación de 16S rDNA y dado que MALDI-TOF mostró concordancia del 100%, los aislamientos restantes fueron identificados sólo fenotípicamente.

Tabla 18: Grado de concordancia en la identificación de las especies de lactobacilos con MALDI-TOF MS y Rep-PCR genomic fingerprinting

Metodología de identificación	MALDI-TOF MS					
	Especies de <i>Lactobacillus</i>	<i>L. crispatus</i> (n)	<i>L. gasseri</i> (n)	<i>L. jensenii</i> (n)	<i>L. johnsonii</i> (n)	<i>L. murinus</i> (n)
Rep-PCR genomic fingerprinting	<i>L. crispatus</i> (n)	25	-	-	-	-
	<i>L. gasseri</i> (n)	-	33	-	-	-
	<i>L. jensenii</i> (n)	-	-	15	-	-
	<i>L. johnsonii</i> (n)	-	-	-	1	-
	<i>L. murinus</i> (n)	-	-	-	-	10
<p><i>Kappa</i> Coeficiente: 1,000 (excelente grado de concordancia) Intervalo de confianza <i>Kappa</i> SE (0): 0.871, 1.129 Intervalo de confianza <i>Kappa</i> SE(1): (1.000, 1.000)</p>						

Figura 16: biotipos de las cepas obtenidas durante la identificación de lactobacilos mediante ensayos de rep-PCR

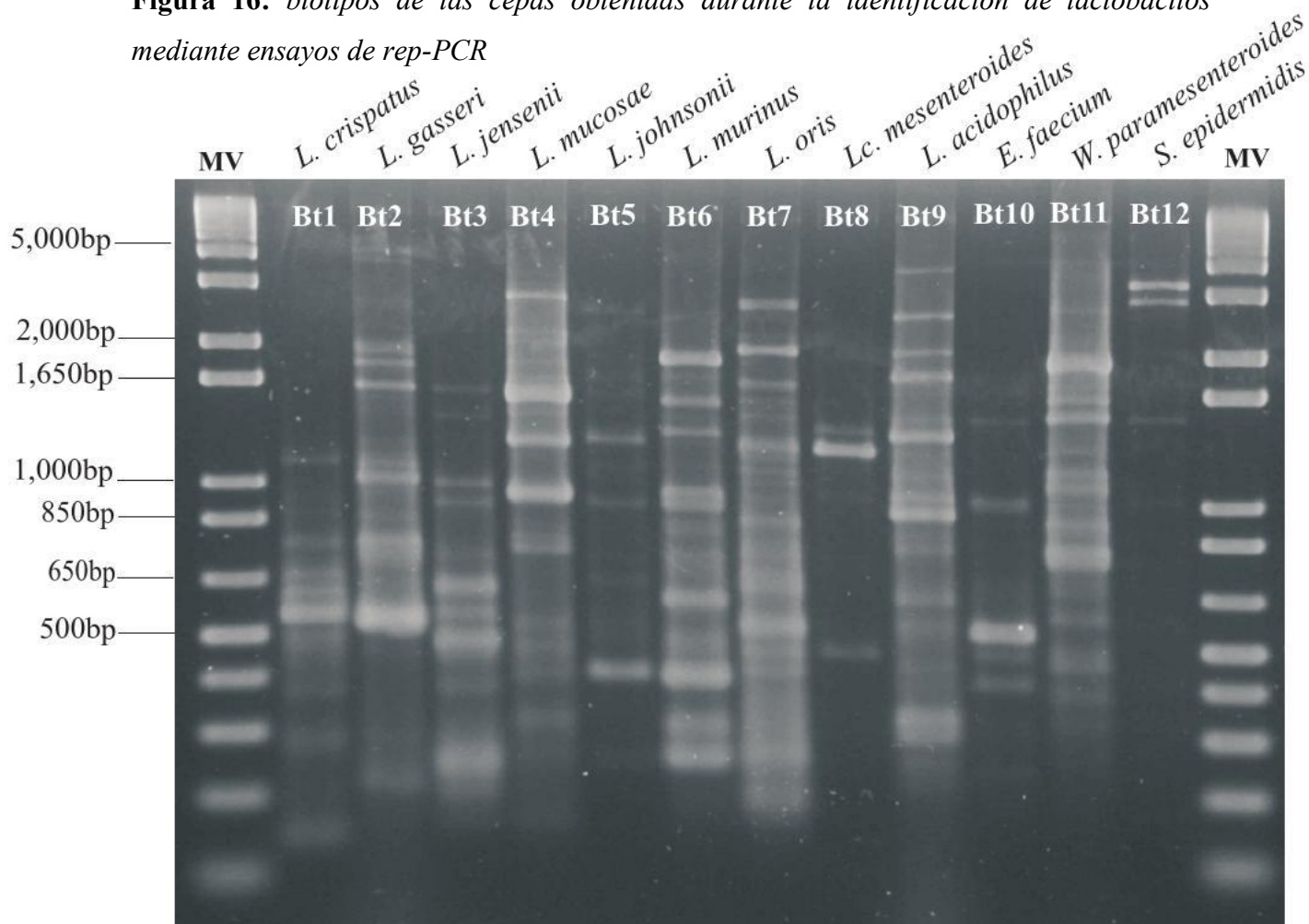


Figura 16: Biotipos representativos obtenidos a partir de la Amplificación polimórfica del ADN de bacterias lácticas (BAL) aisladas de muestras vaginales usando el cebador (GTG)₅. Los perfiles obtenidos incluyen los siguientes biotipos: Bt1 (*L. crispatus*); Bt2 (*L. gasseri*); Bt3 (*L. jensenii*); Bt4 (*L. mucosae*); Bt5 (*L. johnsonii*); Bt6 (*L. murinus*); Bt7 (*L. oris*); Bt8 (*Lc. mesenteroides*); Bt9 (*L. acidophilus*); Bt10 (*E. faecium*) Bt11 (*W. paramesenteroides*) y Bt12 (*S. epidermidis*). MW: marcador de peso molecular (1 kb, Invitrogen). Los métodos se describen en el texto. (Elaboración: C.A. Fico seco, CERELA-CONICET, The Open Microbiology Journal, 2018, 12, 218-229).

➤ **Distribución de especies de lactobacilos. Caracterización fenotípica por pruebas bioquímicas confirmada con metodología centrada en el perfil de proteínas mediante espectrometría de masa (MALDI-TOF)**

Las especies que predominaron en los CV con microbiota normal (EVB I y II) de las participantes que cumplieron los dos controles (3 y 6 meses) fueron *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii* (Figura 17). Una vez purificados los aislados, 112 aislamientos de bacilos no esporulados, gram positivos y catalasa negativos fueron caracterizados como género *Lactobacillus* dentro del grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) a través de las siguientes

pruebas bioquímicas: morfología, producción de CO₂ a partir de glucosa, crecimiento en el medio Man, Rogosa, Scharp (MRS) a 10 y 45°C, crecimiento a 6,5 y 18% de NaCl.

Según la fermentación de azúcar de forma homo- ó heterofermentativa que evidencia la presencia o ausencia de las enzimas fructosa -1,6- difosfato aldolasa y fosfoacetolasa se subclasificó los lactobacilos en tres grupos: **Grupo I** (homofermentativos obligados (HOO) (96,4%), **Grupo II** heterofermentativos facultativos (HF) (3,6%) y **Grupo III** heterofermentativos obligados (HO) (0 %).

Con las pruebas bioquímicas, basada en la fermentación de hidratos de carbono incluidas en este estudio, se determinaron las especies detectándose siete diferentes patrones bioquímicos y en el 93,8 % de los mismos no se pudo establecer una especie, por lo tanto fueron identificadas como dos o tres especies probables, que requirieron la confirmación por espectrometría de masa MALDI-TOF. En la Tabla 19 se muestran los resultados comparativos entre la identificación por pruebas bioquímicas clasificadas en patrones según fermentación de azúcares y MALDI-TOF

Tabla 19: Distribución de patrones bioquímicos según fermentación de Hidratos de carbono, identificación y comparación con identificación en MALDI-TOF

Patron bioquímico	Especie	Hidratos de carbono														Resultado (Pruebas bioquímicas)	Resultados (MALDI-TOF)	
		Arabinosa	Cellobiosa	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Gluconato	Lactosa	Maltosa	Manosa	Melobiosa	Rafinosa	Ramnosa	Ribosa	Sucrosa			Trehalosa
1 (1)	<i>L.crispatus</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>L.crispatus</i> - <i>L.acidophilus</i> / <i>L.gasseri</i> (n = 52)	<i>L.crispatus</i> (n = 37) <i>L.gasseri</i> (n =15)
	<i>L.acidophilus</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	- (d*)	- (d*)	-	-	+	- (d*)		
	<i>L.gasseri</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	- (d*)	- (d*)	-	-	+	- (d*)		
2 (1)	<i>L.acidophilus</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.acidophilus</i> - <i>L.gasseri</i> / <i>L.johnsonii</i> (n = 31)	<i>L.gasseri</i> (n 30) <i>L.johnsonii</i> (n = 1)
	<i>L.gasseri</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+		
	<i>L.johnsonii</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+		

3 (1)	<i>L.acidophilus</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>L.acidophilus/ L.gasseri</i> (n = 1)	<i>L.gasseri</i> (n= 1)	
	<i>L.gasseri</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+			
4 (1)	<i>L.acidophilus</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	<i>L.acidophilus/ L.gasseri</i> (n = 1)	<i>L.gasseri</i> (n = 1)
	<i>L.gasseri</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-		
5 (1)	<i>L.gasseri</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>L.gasseri</i> (n = 1)	<i>L.gasseri</i> (n = 1)
6 (1)	<i>L.gasseri</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>L.jensenii/ L.gasseri</i> (n = 19)	<i>L.gasseri</i> (n 10) <i>L.jensenii</i> (n 9)
	<i>L.jensenii</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+		
7 (2)	<i>L.murinus</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>L.murinus</i> (n 4)	<i>L.murinus</i> (n 4)
No se clasificaron																n = 3	<i>L.crispatus</i> (n = 1) <i>L.gasseri</i> (n = 1) <i>L.oris</i> (n = 1)	
Total cepas																112	112	

‡ 90 % o más corresponde a cepas fermentadoras del HC en referencia, † 90 % o más corresponde a cepas no fermentadoras del HC en referencia y d* 11-89 % cepas fermentadoras del HC en referencia. * no permite diferenciar.

L.crispatus y *L.jensenii* presentaron un único patrón bioquímico, P1 y P6 respectivamente, pero dichos patrones no permitieron la diferenciación con *L.acidophilus/L.gasseri* y *L.gasseri* respectivamente. En estos dos patrones (1 y 6) se observó un comportamiento común ante la fermentación de 4 azúcares ensayados (Lactosa, Melobiosa, Rafinosa y Trehalosa). En relación a *L.gasseri*, sólo una cepa lactosa (-), melobiosa (+) y rafinosa (+) permitió su identificación y la separación de las especies *L.acidophilus*, *L.crispatus*, *L.johnsonii* y *L.jensenii*, con el patrón bioquímico P5. Sobre los 58/60 aislamientos de *L.gasseri* que no se pudieron identificar y separar; 25,9 % compartieron patrón bioquímico con *L.acidophilus* y *L.crispatus*, 56,9 % con *L.acidophilus* y *L.johnsonii*, y 17,2 % con *L.jensenii*. En el grupo II de los heterofermentativos facultativos, se detectaron 4

aislamientos de *L. murinus* y su comportamiento fermentativo ante la arabinosa y gluconato, permitió su diferenciación dentro del grupo e identificación de la especie. Tres aislamientos, según el patrón bioquímico, no pudieron ser identificadas (Tabla 19).

➤ **Distribución de las especies de lactobacilos. Asociación con los métodos anticonceptivos.**

Del grupo de mujeres que cumplieron con el estudio inicial y los controles a los 3 y 6 meses y que conservaron o convirtieron a los EVB I y II se identificaron 112 especies de lactobacilos del total del estudio. La identificación de estos aislamientos fue coincidente en el control de los tres meses con la del control de los seis meses. (Tabla 20). De este grupo, se obtuvo una tendencia a la asociación positiva entre *L. crispatus* y ACO ($p=0,06$ – OR 3,22).

Tabla 20. Distribución de especies de lactobacilos aislados en estado vaginal básico (EVB) I y II por método anticonceptivo en mujeres que cumplieron con el estudio inicial, y los controles a los tres y seis meses.

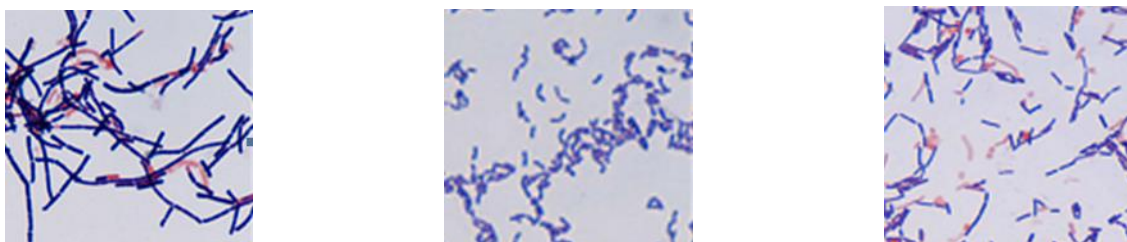
Especie de lactobacilo	METODO ANTICONCEPTIVO			
	ACO	PRE	RIT	ACO+PRE
	n	n	n	n
<i>L.gasseri</i> (n 59)	47	7	4	1
<i>L. crispatus</i> (n 38)	35	1	2	-
<i>L. jensenii</i> (n 9)	6	2	-	1
<i>L. johnsonii</i> (n 1)	1	-	-	-
<i>L.murinus</i> (n 4)	3	1	-	-
<i>L.oris</i> (n 1)	1	-	-	-
Total = 112	93	11	6	2

ACO: anticonceptivos orales - *DIU* dispositivo intrauterino - *PRE* preservativo - *RIT* método del ritmo-
ACO + PRE: doble protección simultánea. * Asociación estadística: *L.crispatus* con *ACO*

De los 43 CV que mantuvieron el EVB I normal en el grupo ACO, desde el inicio hasta el final del estudio, se identificaron 35 aislamientos de lactobacilos. *L. crispatus*, en este grupo de mujeres con estabilidad de su microbiota normal predominó en un 57,2 %, seguido de *L. gasseri* (25,7%), *L. jensenii* (8,6%) y *L. murinus* (8,6%). De los 18 CV que

corrigieron el EVB IV de VB a EVB I y II en el grupo ACO, se recuperaron e identificaron 14 aislamientos de lactobacilos: *L. gasseri* (9) (64.3%), *L. crispatus* (3) (21,4%), *L. jensenii* (1) (7,1%) y *L. johnsonii* (1) (7,1%). Es decir, que la especie aislada con mayor frecuencia luego de una vaginosis bacteriana, fue *L. gasseri*.

Figura 17: Morfología de las especies predominantes aisladas de los CV en la coloración de Gram.



L. crispatus

L. jensenii

L. gasseri

Morfología de *Lactobacillus* spp teñidos con coloración de Gram (observación con aceite de inmersión, $\times 1.000x$). Las cepas bacterianas se cultivaron en medio MRS durante 24 - 48 horas: *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri*.

✓ **Relación de la citología exfoliativa con el estudio del contenido vaginal y factores de riesgo.**

Sobre 123 muestras de CVs obtenidas, se evaluaron simultáneamente los resultados de PAP obtenidos con el cepillado endocervical. Se detectó 40/123 (32,5 %) de estados de disfunción vaginal (EVBs: II, III, IV y V) asociado a anomalías inflamatorias en células de cérvix y displasia cervical (LSIL y ASC-US) (Tabla 21).

En relación a los estados inflamatorios, la reacción inflamatoria vaginal detectada por el recuento de leucocitos (EVBs II y V) se asoció con anomalías inflamatorias inespecíficas en las células endocervicales en 19/41 (46,3 %) de los casos. Cinco de seis de las lesiones LSIL y dos de tres de ASC-US se vincularon con EVB IV y V de microbiota alterada. Específicamente, considerando los CV asociados a LSIL, dos se vincularon con EVBs IV y tres con EVB V, de los cuales en uno de ellos se detectó la presencia de *trichomonas* y en otro *Streptococcus agalactiae*.

Tabla 21: Relación de los resultados de PAP con los Estados vaginales básicos.

EVB	Citología PAP normal n (%)	Citología PAP alterada (n)		
		Anomalías inflamatorias Inespecíficas n (%)	LSIL-lesión (CIN-HPV) n (%)	ASC-US n (%)
I	29(49,1)	22(40)	1(16,7)	1(33,3)
II	12(20,3)	12(21,8)	-	-
III	1(1,7)	1(1,8)	-	-
IV	11(18,7)	13(23,7)	2 (33,3)	1(33,3)
V	6(10,2)	7(12,7)	3 (50)	1(33,3)
Total N = 123	59(100)	55(100)	6(100)	3(100)

LSIL-lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (CIN-HPV) – ASC-US células escamosas anormales atípicas de significado indeterminado.

En la Tabla 22 se muestran los resultados de PAP en relación a los factores de riesgo.

Tabla 22: Relación de resultados de citologías alteradas y factores de riesgo

Factor de Riesgo	Citología PAP normal n (%)	Citología PAP alterada		
		Anomalías inflamatorias Inespecíficos n (%)	LSIL-lesión (CIN1) n (%)	ASC-US n (%)
Antecedentes ITS (n 34)	9 (15,2)	16 (29,1)	6 (100)	3 (100)
Antecedentes obstétricos: > 2 partos	11(18,7)	13(23,6)	-	1(33,3)
Antecedentes obstétricos: abortos	9 (15,2)	5(9,1)	3(50,0)	1(33,3)
Parto en la adolescencia	16 (27,1)	17(30,9)	4(66,7)	2(66,6)
Hábito de fumar	22(37,3)	20(36,4)	5(83,3)	3 (100)
Susceptibilidad genética	6 (10,1)	12 (21,8)	6 (100)	2 (66,6)
Total 122	59	55	6	3

LSIL-lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (CIN-HPV) – ASC-US células escamosas anormales atípicas de significado indeterminado.



DISCUSIÓN

Datos epidemiológicos.

Los datos obtenidos de la encuesta nos permitieron caracterizar a la población de estudio a través de variables relacionadas con la salud sexual y reproductiva y, principalmente, detectar problemas que merecen intervención desde la salud pública. Cabe señalar que se consideró un total de 175 mujeres, pues la diferencia de 40 (población total del estudio 215) corresponde a reingresos en el programa durante los tres años. La clasificación en tres grupos con relación a su condición sexual, donde los Grupos 1 y 2 han sido más representativos por su mayor número de pacientes, marcó varias diferencias generacionales a la hora de analizar las diferentes variables. Con respecto al estado conyugal, la condición de casada o conviviente fue mayor en el Grupo 1 (mayor edad promedio) con un porcentaje dentro del Grupo de 90,2 %, a diferencia del Grupo 2 (menor edad promedio), donde prevaleció la condición de soltera con un porcentaje dentro del Grupo de 64,6 %.

o Edad de inicio de actividad sexual

Al analizar la variable referida al inicio de la actividad sexual, si bien es un dato de mediana confiabilidad, todas las mujeres del estudio respondieron la edad de su inicio y el 98,9 % manifestó tener actividad sexual, lo que simplemente indica que existe una regularidad en todo el grupo y que no se están incorporando casos puntuales, como mujeres sexualmente inactivas, lesbianas o trabajadoras sexuales.

Cuando se analiza la edad promedio de inicio de la actividad sexual no se detectaron diferencias entre los dos grupos: 16,1 años en el Grupo 1 (pareja estable y edad promedio del grupo 32,1 años) y 15,5 años en el Grupo 2 (parejas ocasionales y edad promedio del grupo 25,2 años), lo que demuestra una cierta uniformidad generacional y social del grupo.

Al comparar con los datos estadísticos publicados en la Encuesta Nacional sobre Salud Sexual y Reproductiva del 2013²²⁹, se puede mencionar que el 63 % de toda la población de este estudio ha tenido su primera relación sexual entre los 15 y los 19 años de edad, lo que supera el dato estadístico de 52 % referido para las mujeres de todo el país. Si se analiza el porcentaje de mujeres con una primera relación antes de los 15 años, este estudio detectó un 26,2 %, porcentaje que también resultó superior al referido en dicha encuesta del 17 %.. Este inicio tan precoz de la actividad sexual es claramente un dato preocupante que demanda atención, ya que se asocia a un aumento en la posibilidad de tener un número

mayor de parejas sexuales y, con ello, sus consiguientes riesgos (enfermedades de transmisión sexual, embarazos no deseados).

Las repercusiones que tiene el inicio temprano de la actividad sexual nos genera el interés de establecer los factores que en nuestro contexto social determinan la edad de la primera relación sexual. El nivel sociocultural proporciona las estructuras para la interacción social, donde se definen las reglas de comportamiento, los modos de acción, las actitudes, los valores y las costumbres que se transmiten culturalmente a través de la familia o la escuela, pero evidentemente no resultan suficientes, y desde el ámbito de la salud pública también es importante e imperioso colaborar a través de la consulta médica y, principalmente, de la consejería desde los programas de salud sexual y reproductiva.

○ **Edad del primer embarazo. Número de embarazos.**

El análisis de la edad promedio del primer embarazo mostró una diferencia generacional entre los dos grupos mayoritarios de este estudio, ya que en el Grupo 1, de mayor edad, el primer embarazo se produjo a la edad promedio de 19,6 años y en el Grupo 2, de menor edad, se produjo a los 16,2 años. Si bien existen diferencias en ambos grupos, los dos estarían clasificados dentro de la denominada *fecundidad adolescente tardía*, y esto es un hecho que también merece una preocupación especial, no sólo por el riesgo de mayores complicaciones físicas que representa el embarazo en la adolescencia, sino también porque denota la falta de educación sexual y reproductiva e inclusive podría reflejar una mayor probabilidad de que dicho embarazo sea producto de abuso sexual, relaciones forzadas o explotación sexual. Cabe destacar que en nuestro país, en el año 2013 se produjeron 114.125 nacimientos en adolescentes de 15 a 19 años, según datos suministrados por el Programa Nacional de Salud Integral en la Adolescencia, MSAL-UNICEF (2016)²³⁰.

La distribución de la maternidad adolescente en el país se encuentra estrechamente relacionada con el nivel de desarrollo, de modo que, en general, en el mapa nacional existen grandes brechas en ese sentido. Si bien la provincia de Santa Fe es una de las más ricas, tiene tasas que no difieren demasiado de las que presentan algunas de las jurisdicciones más relegadas (dato de tasa de fecundidad adolescente en la provincia de Santa Fe: 2,7, Formosa: 5,8 y CABA: 0,6)²³⁰. Estos ejemplos, en relación con la situación socioeconómica, dan cuenta de la fuerte influencia que pueden tener en la determinación

de la fecundidad adolescente, otra clase de factores tales como los de índole cultural-ideacional, o los relacionados con el acceso al conocimiento y el uso de métodos anticonceptivos y el acceso a los servicios de salud. Esta clase de factores deberían ser considerados y abordados en profundidad según cada contexto particular, al elaborar e implementar las políticas de salud.

Por otra parte se observó que el porcentaje de mujeres que tuvieron dos o más embarazos fue del 56,3 % para el Grupo 1 y del 16% para el Grupo 2. Al respecto cabe destacar que la maternidad en la adolescencia es una experiencia que se repite para un número considerable de mujeres. Un quinto de los nacimientos que ocurren anualmente en adolescentes son de orden “dos o más”, es decir, de madres adolescentes que ya han tenido uno o más hijos²³⁰. Esto evidencia un patrón de fecundidad de inicio temprano con cortos espacios intergenésicos. Todos estos datos reflejan la necesidad de mejorar la calidad de las instancias de consejería anticonceptiva.

- **Abortos espontáneos. Abortos inducidos por complicaciones irreversibles.**

En la totalidad de las pacientes estudiadas se registró un porcentaje de abortos del 12,6 %.

Al respecto cabe mencionar que se han registrado en el 2014, 8007 egresos hospitalarios de instituciones públicas de todo el país, por abortos en mujeres menores de 20 años.²³¹

Asimismo, un tercio de las 358.000 muertes maternas anuales en todo el mundo son atribuibles a los embarazos no deseados que, en su mayoría, se producen en países de bajos y medianos recursos²³². Sin embargo, estas cifras deben evaluarse con cautela ya que representa una aproximación de la ocurrencia del evento, puesto que la centralización de este indicador presenta dificultades.

- **Antecedentes de infección de en la paciente y en la pareja (gonococia, sífilis, chancro blando, linfogranuloma venéreo, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealiticum*, *Mycoplasma hominis*, *Herpes virus*, hepatitis B C D, papiloma virus humano [HPV], Citomegalovirus, virus de inmunodeficiencia humana [VIH])**

En este estudio cabe señalar que se consideraron solamente datos registrados en el servicio o provenientes de informes de laboratorio de otros hospitales, por lo que los porcentajes descriptos para la totalidad de las pacientes de gonococia (6,3 %), *Chlamydia trachomatis* (2,9 %), papiloma virus humano (1,7 %) y tricomoniasis (6,9 %) son claramente insuficientes a la hora de analizar prevalencias y la distribución de frecuencias en estos antecedentes. Sin embargo, el porcentaje de gonococia y tricomoniasis resulta preocupante, por lo que merece atención, y una de las principales causas la constituye la falta de utilización de anticoncepción de barrera.

Al respecto cabe mencionar que se ha registrado un incremento generalizado de las infecciones de transmisión sexual (ITS) en el mundo occidental, y Argentina no es una excepción. Según la Organización Mundial de la Salud, cada día se producen en el mundo más de un millón de nuevos casos de enfermedades de transmisión sexual, incluyendo las infecciones por VIH, y cada año se producen 357 millones de nuevos casos de ITS curables (sífilis, gonorrea, clamidiasis y tricomoniasis). La OMS también refiere más de 500 millones de personas portadoras del virus que provoca el herpes genital tipo 2 (HSV2), y que más de 290 millones de mujeres están infectadas con el virus del papiloma humano (VPH)²³³. En los países en desarrollo, este grupo de infecciones y sus complicaciones constituyen uno de los cinco motivos principales por los cuales los adultos solicitan atención sanitaria. Las ITS no tratadas tienen repercusiones muy importantes a nivel de salud reproductiva, materna y neonatal, debido a sus complicaciones tanto maternas y perinatológicas, como de fertilidad²³³.

- **Antecedentes familiares de enfermedades preneoplásicas y neoplásicas en el aparato genital**

En el presente estudio se detectó que un 13,1 % del total de las mujeres estudiadas que manifestaron antecedentes familiares de primera y segunda línea de enfermedades preneoplásicas y neoplásicas. La realización del PAP en un grupo dentro de la población integral estudiada nos ha permitido indagar acerca de ese factor de riesgo. Si bien el tamaño muestral resultó insuficiente para el análisis estadístico, los datos obtenidos permiten estimar cierta relación entre los antecedentes familiares y mujeres con lesiones precancerosas.

Al respecto cabe destacar que el cáncer cervicouterino (CCU) es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres de regiones menos desarrolladas en el mundo y la tercera causa más importante de muerte por cáncer en las mujeres. Se estima que en el año 2012 se produjeron 445.000 casos nuevos (84 % de los nuevos casos mundiales) y que aproximadamente 270 000 mujeres murieron a causa del CCU, correspondiendo más del 85 % de esas muertes a países de ingresos bajos y medianos. Dos tipos de virus del papiloma humano (VPH 16 y 18) causan el 70 % de los cánceres de cuello uterino y las lesiones precancerosas de cuello uterino. De tal forma que la infección por VPH no detectada y no controlada puede generar repercusiones muy importantes en la salud sexual y reproductiva²³⁴.

- **Enfermedad de base: diabetes, parasitosis, incontinencia urinaria o fecal, malformaciones congénitas, deficiencia inmunológica.**

Dado el bajo porcentaje de las pacientes en las que se detectó diabetes e incontinencia, no se pueden realizar conclusiones sobre dichas variables. Inclusive, actualmente no se han realizado publicaciones que relacionen estas variables (diabetes, parasitosis, incontinencia urinaria o fecal, malformaciones congénitas, deficiencia inmunológica) con la salud sexual de la mujer.

- **Estudios realizados en los últimos seis meses**

Según los datos de este estudio, considerando el ítem de la encuesta que refiere a controles y estudios ginecológicos realizados en los últimos seis meses, se registró un muy bajo porcentaje (7,4 %), lo que reflejaría la existencia de grupos significativos de mujeres con mayor susceptibilidad y más expuestas a factores de riesgo. Conocer los motivos por los cuales las mujeres dejan de asistir a los controles médicos en el momento en que estos son primordiales para su salud es un paso importante para revertir esas situaciones. En nuestra realidad, uno de los motivos a considerar es la falta de médico especialista en ginecología en nuestro centro, como así también la falta de equipos de diagnóstico (ecografías, mamografías, etc.), lo que obliga a las pacientes a viajar a Santa Fe Capital, y sólo lo hacen frente a la necesidad de un diagnóstico, pero no así para realizar sus controles periódicos.

Al respecto cabe mencionar que dentro de las prácticas preventivas, la periodicidad en los controles ginecológicos es un aspecto fundamental para la prevención del cáncer. Sin

embargo, la concurrencia de las mujeres a dichos controles disminuye al finalizar el periodo fértil y con la edad, lo que coloca a las mujeres adultas en una situación de mayor vulnerabilidad. Según este estudio se observó mayor frecuencia de asistencia a controles en el Grupo 2 (de menor promedio de edad). Tal vez esta mayor preocupación en las mujeres de 20 a 30 años de edad responda a una mayor concientización lograda a través de los programas de salud sexual. Según la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo del 2013, considerando la totalidad del país, se registró un incremento desde el año 2005 al 2013 en la realización de prácticas preventivas, principalmente en lo referente a mamografías y Papanicolau. Tal es así que la realización de esta última práctica, en las mujeres de 25 a 65 años se incrementó de 60,6 % a 71,6 %^{235,236}.

○ **Mujeres fumadoras**

En la totalidad de las pacientes estudiadas, se detectó un 36% de fumadoras. Esta cifra resulta preocupante, dado que el tabaquismo representa uno de los factores de riesgo reconocidos asociado al cáncer cervicouterino, y además en las mujeres que optan por anticonceptivos hormonales, eleva el riesgo de desarrollo de una enfermedad vascular coronaria. Tal es así que se ha demostrado que utilizar anticonceptivos hormonales en distintas presentaciones (píldoras, parches o anillos) aumenta el riesgo de trombosis, favoreciendo la aparición de episodios cardiovasculares graves, como los infartos²³⁷.

El tabaquismo constituye una epidemia a nivel mundial cuyas consecuencias nocivas en la salud de las personas continúan en aumento. En el mundo mueren alrededor de 6 millones de personas al año por cuestiones relacionadas con el tabaco. Se estima que, de mantenerse la tendencia de los indicadores de tabaquismo, para el 2030 la cantidad de muertes asociadas ascenderá a más de 8 millones anuales en el mundo²³⁶.

➤ **Clasificación de sintomáticas y asintomáticas: signos-síntomas más frecuentes manifestados en el estudio de base. Relación con el EVBs detectado, levaduras y trichomonas.**

Cabe destacar que cerca de un 50 % de las pacientes asintomáticas evaluadas en este estudio presentaron estados de disfunción vaginal, lo que coincide con lo descrito en un estudio previo de nuestro grupo²³⁸ y por otros autores^{165,239}. Por este motivo, resulta imprescindible el estudio morfológico del contenido vaginal, independientemente de la

presencia de síntomas, con el fin de detectar la disfunción vaginal. Además cabe destacar que aún en ausencia de síntomas, se detectaron levaduras en el EVB I (9,5%), lo que probablemente se realcione con un estado de portación, que no requiera de tratamiento específico. También cabe destacar la detección de trichomonas mediante BACOVA en pacientes asintomáticas, que si bien resultó menos frecuente (1,4%) que lo detecte esta metodología, dada la baja sensibilidad de la microscopía en estas pacientes que presentan un bajo número de parásitos, resultó de fundamental importancia su detección ya que requiere de tratamiento específico por tratarse una ITS

Dado que el valor predictivo positivo y negativo del diagnóstico sindrómico para distinguir el estado de vaginosis o vaginitis no supera el 50 %^{238,239}, es importante efectuar el estudio de los EVBs, ya que representa una herramienta diagnóstica inicial de utilidad accesible a los laboratorios de baja complejidad, que permite orientar la investigación de la disfunción vaginal, independientemente de la presencia de síntomas. Con este criterio de clasificación en EVBs se genera un informe de laboratorio eficiente para asegurar el seguimiento clínico-terapéutico racional de la disfunción vaginal en el marco de la atención primaria de la salud de la mujer.

Por otra parte, el elevado porcentaje de pacientes asintomáticas detectadas en el estudio de base (63,7 %) refleja que muchos de los signos y/o síntomas no son reconocidos. Estas pacientes están caracterizadas como asintomáticas porque no manifestaron síntomas o signos evidentes en el momento de la consulta. Esto no elimina la posible actitud de “acostumbramiento” a ciertos síntomas menores. La distribución obtenida basada en el cuestionario mostró que en los EVBs alterados, en ausencia de levaduras y/o trichomonas, la frecuencia y el tipo de signos y síntomas fue bastante similar, por lo que el diagnóstico sindrómico basado exclusivamente en el examen clínico, como ya se ha demostrado anteriormente²³⁸, tiene muchas causas de error y genera un alto grado de inexactitud. Sin embargo, en los casos de vulvovaginitis candidiásica y tricomoniasis, se detectó asociación estadística con signos y síntomas urogenitales, por lo que se puede concluir que el diagnóstico sindrómico de estas dos entidades clínicas podría ser más eficaz.

Por otro lado, cabe aclarar que la virulencia y la patogenicidad de las levaduras y trichomonas están estrechamente relacionadas con la presentación de las formas clínicas de la enfermedad en el hospedero humano.

En relación con la presencia de levaduras, se ha detectado únicamente asociación estadística significativa con prurito. En la patogenia de la candidiasis la invasión epitelial ocasiona la liberación de una serie de sustancias (prostaglandinas, bradikinina) con capacidad de inducir cambios inflamatorios a nivel local, y ello ocasiona edema, eritema, prurito y un ligero incremento del flujo vaginal¹⁵³.

En la patogenia de la *Trichomonas vaginalis* se demostró que la infección provoca una agresiva respuesta inmune celular local con inflamación del epitelio vaginal y del exocervix, acompañada por lesiones hemorrágicas. Esta respuesta inflamatoria induce una gran infiltración de leucocitos, incluyendo linfocitos CD4 y macrófagos²⁴⁰.

Las trichomonas invaden y tienen la capacidad también de degradar inhibidores de proteasas secretados por los leucocitos²⁴¹. Todo ese evento generalizado se puede visualizar en un cuadro clínico de variable intensidad, relacionado probablemente con el número y la virulencia del parásito, con la resistencia del huésped y con el valor de pH en la vagina.

En este estudio cada paciente presentó varios síntomas y signos a la vez, y se detectó asociación estadística con aumento de flujo (leucorrea), dispareunia, metrorragia, ardor, dolor pélvico y disuria.

El cuadro clínico clásico, en las sintomáticas, descrito en la tricomoniasis con presencia de leucorrea de tipo purulento, verdoso, espumoso, de olor fuerte e irritación vaginal, no siempre está presente, y ha sido cuestionado en su sensibilidad y en su especificidad²⁴¹. Sin embargo en este estudio, la leucorrea ha estado presente en el 100 % de las sintomáticas, coincidiendo lo manifestado por las pacientes con el examen físico. Lo que resultó variable es el aspecto, dado que se han observado contenidos vaginales de color blanco, amarillo o verde, espumosos, inodoros o de olor fuerte.

El ardor estuvo presente en el 92 % de las mujeres sintomáticas y, cabe considerar que es una de las consecuencias de la irritación genital, lo que también se ha podido corroborar con el examen ginecológico²⁴². Como consecuencia de la irritación, no se descarta su asociación con la dispareunia²⁴³. La disuria detectada en el 60 % de las sintomáticas es también un dato relevante a considerar ya que se ha demostrado que este síntoma de presentación de la infección por trichomonas puede aparecer asociado a una

endometritis²⁴³, y lo que podría justificar y relacionar el 29 % de metrorragia informada por las pacientes infectadas, como así también el 87,5 % del dolor pélvico.

- **Dimensión global del problema de la disfunción vaginal: prevalencia de EVBs previos a la anticoncepción y detección de levaduras y trichomonas, en la población integral estudiada.**

La distribución de EVBs en este grupo de mujeres en edad fértil mostró una dimensión de 44,5 % de mujeres en edad fértil asintomáticas con algún grado de disfunción vaginal. Esta cifra resultó similar a la descripta por distintos estudios realizados en varias regiones del país, que refieren alrededor de un 50%.^{125,238,239}

Del total de las pacientes estudiadas, un 25,1 % mostró un estado de vaginosis, incluyendo MI (3,7 %) y VB (21,4 %), lo que indica que una de cada cuatro mujeres manifiesta una alteración funcional primaria típica (sin RIV). A este grupo se debe agregar un 15,8 % de mujeres con el estado de VMI, en las cuales a la disfunción primaria (vaginosis, VN de 4 a 6 y de 7 a 10) se le ha agregado una respuesta inflamatoria significativa que indicaría en mayor medida, un estado infeccioso vaginal y/o del tracto genital (cervical y/o superior) o, en menor proporción una infección del tracto urinario. Comparando con estudios similares, en mujeres en edad fértil no embarazadas, la prevalencia de estados de VB detectada en esta serie es coincidente con otros autores, ubicándose en el rango de 20 a 30%^{148,150,181}. En la serie de mujeres con estado V de VMI (15,8 %), se debe diferenciar 4,7 % que correspondieron a vaginitis inespecífica y separarla de otras formas de vaginitis convencionales con hallazgos habituales de patógenos tales como trichomonas principalmente y en menor medida levaduras, consideradas mas adelante. La condición patológica mencionada en la literatura, que coincide con el estado de vaginitis inespecífica según la metodología BACOVA, es la vaginitis aeróbica definida según los criterios microscópicos de Donders y col²⁴⁴. Dichos autores evaluaron individualmente este síndrome y detectaron una prevalencia global de 14,6%, correspondiendo un 7,5% a la forma moderada a severa, similar a la obtenida en este estudio.

La diferenciación del estado de vaginitis con VN 4-6 correspondiente tanto a la presencia de morfotipos comensales aeróbicos como a microbiota intermedia, del VN 7-10 de microbiota alterada, permite destacar coincidiendo con Donders y col.^{145,244}, que se trata

de dos condiciones diferentes. Es decir en este estudio al considerar las VMI sin patógenos convencionales (4,7%), correspondieron 2,8% a VN de 4-6 con RIV a microbiota intermedia y a la presencia de morfotipos comensales característicos de la vaginitis aeróbica, como *S. agalactiae* y además un 1,9% a VN de 7-10 con RIV, en los cuales probablemente se produzca un grado de superposición de vaginosis bacteriana y vaginitis aeróbica. Esta última situación mixta explicaría porque algunas mujeres con VB tienen aumento de leucocitos y una descarga que no es homogéneamente gris y acuosa como la que se genera en VB sola. Este estado de vaginitis inespecífica, indicador de un posible desequilibrio marcado y persistente que aumenta el riesgo gineco-obstétrico, enfatiza la necesidad de continuar su evaluación.

La posibilidad de vaginitis atrófica es muy remota, pero en todos los casos de RIV significativa se debe explorar en forma inmediata el origen de esa respuesta mediante estudios especializados. Es entonces destacable que la vaginosis en sus dos variables (MI y VB), típica o en casos con RIV ya establecida, alcanzó a una de cada dos de las mujeres estudiadas en esta serie.

En relación a las levaduras detectadas en este estudio (28,4%), sólo 42,6% se asociaron con RIV como único patógeno, con un EVB II, las restantes podrían ser consideradas como colonizantes de la microbiota normal.

La fortaleza de este estudio se basa en la homogeneidad social del grupo analizado, con un promedio similar de actividad sexual en dos de los tres grupos estudiados. Esta situación resultó ideal para la comparación de la influencia del método anticonceptivo usado sobre la prevalencia relativa de los EVBs y la frecuencia ecológica de detección de levaduras. Sin embargo, en el caso de trichomonas resulta diferente, ya que su presencia está regulada por conductas sexuales puntuales. Cabe destacar la mayor prevalencia de TV detectada en este estudio (12,6 %) en relación a cifras descriptas en población general en el área del Gran Buenos Aires y Capital Federal, donde las frecuencias oscilan entre el 2 % y el 3 %^{125, 239}. Asimismo, en este estudio también se detectó la portación de trichomonas sin RIV en un 3,7% del total de las trichomonas detectadas.

Esta dimensión elevada de disfunción vaginal primaria (vaginosis) y vaginitis, así como la elevada prevalencia de TV, revelan la necesidad de revisar el protocolo de seguimiento de

mujeres enroladas en los programas de controles de natalidad, con especial referencia a la incorporación del estudio del EVB en cada una de las visitas de control.

➤ **Corte de prevalencia. Frecuencias relativas de EVBs en función del método anticonceptivo utilizado durante tres y seis meses.**

Cuando se analizaron las frecuencias relativas de EVBs en función del método anticonceptivo utilizado después de tres y seis meses, el algoritmo diagnóstico priorizó el EVB que se detectó en cada caso independientemente del EVB anterior, y se analizó prolijamente y en forma comparada la influencia de los métodos anticonceptivos. Este estudio demostró que existen diferencias significativas en las frecuencias de los EVBs en función de la utilización de tratamientos anovulatorios hormonales, preservativos, factores de ritmo natural ovulatorio y el uso de implante de DIU.

Cabe destacar que el uso de cualquier anticonceptivo requiere de un consenso o discrepancias de pareja, pero que en todos los casos el factor psicológico no puede dejar de tenerse en cuenta, ya que estudios recientes demuestran su significativa asociación con la DV^{125,180,181,190,194}.

El uso de ACO que posee acción directa sobre el mecanismo hormonal ovulatorio, generó un aumento de mujeres con MN y disminuyó la frecuencia de VB. Si bien se trata de un factor “externo”, en realidad es un regulador de equilibrios hormonales. Estos resultados también se vieron avalados por el estudio de los procesos de conversión.

Por otra parte, cabe aclarar que este estudio sólo analizó la utilización de preservativos masculinos, que representan el factor externo por excelencia. Sin embargo, su uso también puede generar problemas que podrían alterar factores psicológicos con cierta continuidad. Cabe destacar que su utilización, tanto a los tres meses como a los seis, determinó una influencia marcada sobre la MV, disminuyendo la frecuencia de EVB I de MN, incrementando el EVB IV, y a los seis meses se detectaron efectos sobre la RIV, evidenciados por el aumento de los EVB II y V. Estos resultados también se vieron avalados con el análisis prospectivo, donde la conversión a EVBs con RIV permitió atribuir su influencia.

El sistema anticonceptivo por ritmo fue utilizado por un número reducido de casos; sin embargo, las tendencias demostradas en relación a la protección de la microbiota, tuvieron niveles de significación confiables, que avalan la hipótesis planteada. Se trata de un factor

no externo, en términos de la utilización de drogas o barreras, pero se asocia a factores psicológicos poco frecuentes de consenso de la pareja. Este estudio demostró cierto nivel de estabilidad de los EVBs, que también se pudo avalar con el análisis prospectivo de los procesos de conversión.

En relación al DIU, que se trata de un factor externo con permanencia física por largos períodos de tiempo, se detectó una tendencia al desbalance de la microbiota vaginal, es decir una vinculación con EVB de VB. Sin embargo, sería necesario incrementar el número de casos para confirmar estos hallazgos.

La doble protección simultánea fue aceptada por sólo tres pacientes del estudio, con lo cual la baja frecuencia de utilización, no permitió su análisis.

➤ **Reconocimiento de procesos de conversión en función del método anticonceptivo, evaluados a los tres y seis meses del inicio.**

Según los resultados de esta investigación, se observó que el uso del ACO tendió a proteger la microbiota normal, a la vez que fue capaz de disminuir la frecuencia de vaginosis bacteriana. Dichos hallazgos, coincidentes con los resultados obtenidos en los cortes de prevalencia y distribución de frecuencia de EVBs por método anticonceptivo (3 y 6 meses) previamente mencionados, se pueden relacionar con el aporte hormonal del ACO, reforzando la hipótesis del factor estrógeno en la frecuencia de la disfunción vaginal. Estos resultados fueron similares a los descritos por un reducido grupo de publicaciones que hacen referencia a este tema y en las que ha sido analizado exclusivamente el efecto de hormonas^{180, 181, 182, 245, 246, 247}. Cabe aclarar que este mecanismo de protección, que ha sido demostrado tanto para las hormonas sexuales de producción endógena como para las de administración exógena, ejerce su efecto sobre la mucosa vaginal a través de los receptores celulares al estimular la multiplicación del epitelio y, así, garantizar una buena concentración de glucógeno en las células intermedias, como punto clave en la sobrevivencia de los lactobacilos y en el mantenimiento de un pH protector^{248, 249}.

Además, la hipótesis de esta investigación también se ve avalada con estudios que han documentado una importante actividad de bombeo de protones (por una H⁺ - ATPasa) en la membrana apical (luminal) de las células de los epitelios vaginal y cervical estimulada por los estrógenos, la que disminuye en la menopausia, con el consecuente aumento del pH vaginal⁹.

Asimismo, Vodstrcil et al.¹⁸², además de plantear la influencia protectora de las hormonas esteroides exógenas en el ambiente vaginal, demostraron que más del 50 % de las mujeres que padecían VB recurrente luego del tratamiento con antibióticos de primera línea, al recibir anticoncepción hormonal mostraron una mejora significativa en la recurrencia de esta DV¹⁸².

Los resultados de este estudio demostraron que no se produjeron diferencias significativas en las mujeres con VB tratadas con antibióticos y ACO y las asintomáticas que solamente iniciaron ACO. El fracaso del tratamiento de la VB con antibióticos probablemente sea debido a desordenes hormonales sistémicos, o bien a una escasa efectividad de los antibióticos por la formación de un biofilm vaginal²⁵⁰.

Asimismo, cabe destacar que según los resultados de esta investigación, el uso del ACO combinado favoreció la colonización por levaduras en las mujeres sanas, ya que se detectaron tanto después de tres como de seis meses nuevas portadoras de levaduras que en cerca de un 50 % no estuvieron asociadas a RIV, al igual que lo descrito por diferentes autores^{154, 180, 182, 245, 247,249}. Aun así, no se puede descartar que esta colonización represente un factor predisponente para la vulvovaginitis recurrente. La hipótesis planteada sobre el biofilm también podría explicar el motivo por el cual *Candida* spp. generalmente crece en exceso cuando las bacterias están dispersas y las células epiteliales están expuestas, ya que debe adherirse a las células para colonizar la vagina^{5,251}, lo que justificaría la baja prevalencia de asociación de levaduras y estados de VB²⁵⁰.

El uso de preservativos masculinos generó conversión a EVBs con RIV (EVB II y V). Estos resultados coinciden con la bibliografía que hace referencia a la presencia de dermatitis vaginales, vulvovaginitis alérgicas e irritativas y estados inflamatorios asociados al uso de preservativos, ya sea por la influencia del látex o por los espermicidas (nonoxinol-9)²⁵². Una mucosa vulvar no queratinizada, así como la humedad en la que se encuentra inmersa, favorecen la penetración de agentes irritantes y alérgenos, lo que genera estados típicos de vaginitis con reacción inflamatoria vaginal^{253, 254}.

Con respecto a la influencia del método del ritmo, aunque es actualmente considerado uno de los métodos menos elegidos, se demostró en los seis meses una tendencia a la protección de la microbiota vaginal normal, la que podría estar relacionada con que el microambiente vaginal de estas mujeres se encuentra exclusivamente bajo la influencia hormonal sistémica en la etapa ovulatoria, que favorece el desarrollo de los lactobacilos, sumado, además, a que en el período de abstinencia sexual prolongada no hay exposición

local al semen y a leucocitos como modificadores del microambiente²⁵³. Sin embargo, sería necesario incrementar el número de pacientes para confirmar estos hallazgos.

Por otra parte, en este estudio, con el seguimiento de las pacientes que seleccionaron el método del DIU, se observó que las portadoras mostraron una tendencia al desbalance de la microbiota vaginal en función del tiempo, aunque resultaría necesario incrementar el número de casos para confirmar estos hallazgos. Resultados similares fueron descritos por Gupta et al.¹⁸⁰, quienes refirieron que los métodos de barrera alteran el ecosistema vaginal, ya que representan un cuerpo extraño con permanencia física por largos períodos de tiempo. Madden et al.²⁵⁵ demostraron que la incidencia de VB fue superior en las usuarias de DIU en relación con otros métodos, y detectaron una asociación positiva con los sangrados vaginales irregulares y con una microbiota vaginal intermedia presente en la implantación del dispositivo.

➤ **Identificación de lactobacilos: validación del método fenotípico (MALDI-TOF) con el método genotípico.**

De acuerdo con las teorías de ‘exclusión competitiva’ e ‘interferencia bacteriana’, cuando los lactobacilos dominan, las técnicas independientes del cultivo han demostrado que la vagina sana es habitualmente colonizada por una o dos especies dominantes de *Lactobacillus*^{256,257}. Las especies estrechamente relacionadas dentro de este complejo son difíciles de diferenciar por métodos fenotípicos, que explican la variación en las especies de lactobacilos referidas en diferentes estudios²⁵⁸. Se ha podido demostrar en este estudio, a través de los patrones bioquímicos de fermentación de hidratos de carbono, que la mayoría de las especies no se ha logrado diferenciar y por lo tanto, fue necesario completar y confirmar con otras técnicas. Es decir que la fermentación de hidratos de carbono no permitió diferenciar *L. gasseri* de *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. crispatus* y *L. johnsonii*, ni tampoco la totalidad de las especies de *L. jensenii* pudieron ser diferenciadas de *L. gasseri*, ni la totalidad de las especies de *L. crispatus* de *L. acidophilus* y *L. gasseri*.

En lo que respecta a la comparación de MALDI-TOF MS con Rep-PCR *genomic fingerprinting* para evaluar su utilidad en la identificación de las especies de lactobacilos vaginales, se logró un 100% de concordancia al identificar 84 aislamientos de lactobacilos. Por lo tanto, la espectrometría de masa resultó un método confiable y rápido para identificar las especies de lactobacilos vaginales, que puede ser implementada en la práctica clínica.

Al realizar la comparación con otros estudios que utilizaron estos dos métodos de identificación, sin tener en cuenta los distintos grupos de lactobacilos incluidos y las muestras de origen, los porcentajes de concordancia fueron menores con respecto a los obtenidos en este estudio. Tal es así como Callaway et al., refirieron un 93 % de concordancia en la identificación de lactobacilos aislados de caries dentales, siendo *L. gasseri* la única especie coincidente con las evaluadas en este estudio²⁵⁹. Asimismo, Angelakis et al., relataron un 92 % de concordancia en la identificación de lactobacilos provenientes de alimentos probióticos y yogures²⁶⁰ y Duskova et al., describieron un 74 % de concordancia en la identificación de lactobacilos de productos lácteos y cárnicos²⁶¹. Cabe aclarar que estos dos últimos estudios hacen referencia a especies distintas de las consideradas en este estudio.

Sin embargo, cuando se analizaron estudios que compararon estas dos metodologías para la identificación de lactobacilos vaginales, los porcentajes de concordancia fueron similares. Tal es así como, Anderson et al. describieron 97,4 % de concordancia en aislados vaginales y 90,5 % en aislados de cavidad oral, evaluando especies como *L. gasseri*, *L. crispatus* y *L. jensenii*, al igual que en este estudio²⁶².

En relación al único aislamiento de *L. johnsonii* de este estudio, se observó concordancia entre ambos métodos. A diferencia de lo publicado por Dec et al., quienes describieron que MALDI-TOF produjo más de un resultado de identificación para el 11,5 % de aislamientos examinados (principalmente de la especie *L. johnsonii*). Cabe considerar que se requiere de un mayor número de aislamientos para concluir acerca de la utilidad de la espectrometría de masa en la identificación de esta especie²⁶³.

Por último, tanto la secuenciación 16S rDNA como MALDI-TOF revelaron una nueva especie en vagina, *L. murinus*, asociada con la microbiota vaginal, no descrita hasta el momento en la literatura.

La excelente concordancia de la espectrometría de masa con el método genotípico se puede atribuir al cumplimiento estricto en la preparación de las muestras, que juega un papel clave, principalmente en bacterias Gram positivas. Además cabe aclarar que para todos los aislamientos, se consideró un resultado confiable en las identificaciones de género y especie cuando al menos se obtuvieron los 2 mejores *scores* ($\geq 1,70$) midiendo la misma

especie. Schulthess B et al. consideraron que se puede incrementar aún más el rendimiento y mejorar las tasas de identificación de especies del MALDI-TOF con la expansión de la base de datos comercial, generando los propios espectros de referencia ²⁶⁴.

➤ **Distribución de las especies de lactobacilos según el método anticonceptivo**

La distribución de las especies de lactobacilos obtenida en este trabajo es coincidente con reportes que describen como las especies más frecuentes a *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. iners*. Particularmente en este estudio, las especies predominantes en toda la población analizada fueron *L. gasseri*, *L. crispatus* y *L. jensenii*, tal como lo describe la literatura, aunque con algunas diferencias según las mujeres estudiadas en diferentes partes del mundo^{36,111}. Sin embargo, cabe aclarar que los resultados obtenidos dependen de técnicas sesgadas como el cultivo.^{265, 266, 267, 268} La limitada capacidad del cultivo puede ser el resultado de la combinación óptima de nutrientes, temperaturas de crecimiento, niveles de oxígeno disuelto o, potencialmente, la necesidad de cocultivar con socios microbianos clave²⁶⁹. Inclusive algunas especies, como *L. iners*, se dificulta su recuperación por cultivo y no desarrolla en los medios convencionales para lactobacilos como agar Mann Rogosa Sharp.

Sin embargo, la mayor prevalencia de *L. gasseri* obtenida en este estudio en toda la población integral difiere de reportes que presentan un marcado predominio de *L. crispatus* y menor frecuencia de *L. gasseri* y *L. jensenii*^{256, 270, 271}.

Al analizar la distribución de las especies según el método anticonceptivo se puede destacar que en los grupos ACO y RIT, que marcan la influencia hormonal exógena y endógena respectivamente, se obtuvo principalmente *L. crispatus* y *L. gasseri*, con predominio del segundo. Sin embargo, cabe señalar que se detectó estabilidad del EVB I normal y una tendencia a la asociación positiva de *L. crispatus* con ACO a los seis meses de su inicio, comparable con estudios que evaluaron la influencia del ciclo menstrual y sugieren consistentemente que los niveles de estradiol promueven el desarrollo de los lactobacilos, en particular de *L. crispatus*^{272, 273}.

En el grupo PRE se detectó un ligero predominio de *L. gasseri*, a diferencia de lo descrito por Ma et al.²⁷⁴, quienes hallaron una fuerte asociación con *L. crispatus*. Sin embargo, sería necesario incrementar el tamaño muestral para confirmar estos hallazgos.

Cabe señalar que *L. crispatus* es capaz de acidificar el medio vaginal a pH de 4,0, mientras que otros, como *L. gasseri*, alcanzan un pH que oscila entre 4,4 y 5,0^{266,275}. Además, más del 85% de los aislamientos de *L. crispatus* suelen ser fuertemente productoras de H₂O₂, a diferencia de los de *L. gasseri*, que solamente lo son en menos de un 50 %^{275, 276,277}.

Dichas consideraciones califican a *L. crispatus* como una de las especies de mayor protección. Tal como se mencionó anteriormente, hay una fuerte asociación con los estrógenos^{272,273}, y es entonces admisible reconocer la influencia de la estimulación hormonal sobre un ecosistema vaginal normal y saludable, lo que permitiría reducir el uso indiscriminado de tratamientos antimicrobianos. Asimismo, en este trabajo se detectó que la especie predominante en la microbiota recuperada después de un estado de vaginosis bacteriana fue *L. gasseri*. Estudios actuales también relacionan a *L. gasseri* con una microbiota menos protectora y con una mayor predisposición a estados de vaginosis bacteriana, dada su menor capacidad de disminuir el pH vaginal y de producir fuertemente agua oxigenada^{278, 279}.

Las especies dominantes de *Lactobacillus* pueden diferir racial o geográficamente, pero el principio de dominio numérico persiste, y es un importante mecanismo de defensa^{255, 256}. El hallazgo de *L. murinus* en un porcentaje significativo destaca la relación de especies con diferencias geográficas. En nuestro caso, ocho de las diez portadores de esta especie son trabajadores rurales de granjas lecheras y consumidores de leche no pasteurizada.

✓ **Relación de la citología exfoliativa con el estudio del contenido vaginal y factores de riesgo.**

La detección del proceso inflamatorio, visualizado a través del recuento de leucocitos, como así también a través de alteraciones epiteliales, más el estudio morfológico integral de la microbiota vaginal, han sido y son el *gold standard* en la DV y en la detección de estadios proliferativos para la orientación diagnóstica. En este grupo, donde se ha evaluado simultáneamente el contenido vaginal y la citología cervical (PAP), se ha detectado un 57 % de estados de disfunción vaginal (EVBs: II, III, IV y V) asociado a anomalías inflamatorias en células de cuello y displasia cervical (LSIL y ASC-US). Este es un dato que nos genera interrogantes: ¿afectación y/o compromiso del cérvix como estructura regional próxima?, ¿causa o consecuencia?, ¿disfunción en vagina y/o alteración del

cérvix?. Se ha demostrado que la DV aumenta significativamente el riesgo de desarrollar colonizaciones ectópicas por bacterias intestinales, ambientales, y por infecciones de transmisión sexual, y esto avala una clara vinculación de estados alterados, infecciones consecuentes y estructuras regionales comprometidas. Existen varios mecanismos por los que estos agentes podrían estar implicados en el progreso de las lesiones neoplásicas cervicales; indirectamente, mediante el aumento de la susceptibilidad del epitelio inflamado a agentes cancerígenos o directamente, a través de la supresión de la inmunidad mediada por células que permiten al patógeno persistir, aumentar la vulnerabilidad del huésped, facilitar e inducir reactivaciones virales en lesiones pretumorales²⁸⁰.

En este estudio al relacionar los estados de vaginosis bacteriana (IV) y vaginitis con microbiota alterada (V) con los resultados de la citología PAP, se observó que el 59,3 % y el 64,7 % respectivamente se asociaron a citologías alteradas y, paralelamente, en un 11,1 % y en un 23,5 % respectivamente se detectó displasia cervical. A pesar del bajo número de casos, estas asociaciones indican cierta relación, y de esta forma los estados de microbiota alterada pueden tener un papel importante en el desarrollo de la displasia. Uthayakumar, S. et al. ya en el año 1998 lo planteaban como un interrogante²⁸¹. Posteriormente, diversos estudios han referido mayores prevalencias de VB, entre 25 a 60% en pacientes con VPH ^{282,283}. Asimismo, se ha demostrado que la vaginosis bacteriana, altera el microambiente vaginal y por lo tanto ha sido identificada como cofactor en la persistencia de una infección por VPH ^{283,284}. En coincidencia con dichos autores, en este estudio se detectó una asociación entre microbiota alterada (estados IV y V) y displasia cervical. Si bien tres de los cinco casos con microbiota alterada correspondieron a EVB V inflamatorio, en dos de ellos se detectó la presencia de patógenos como trichomonas y *Streptococcus agalactiae* que explicarían la presencia de reacción inflamatoria^{283,284}. Es importante destacar que VPH no se asocia a reacción inflamatoria, inclusive se incrementan las interleuquinas antiinflamatorias que generan estados de inmunosupresión y que a su vez contribuyen a la evolución de la displasia a cáncer^{283,284}.

Entre los factores de riesgo para la generación de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y el cáncer de cuello uterino se han mencionado los antecedentes de ITS y, si bien en este estudio el grupo es pequeño, el 100 % de las pacientes con resultados de PAP de LSIL-lesión (CIN1) y ASC-US tenían antecedentes de ITS por *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria*

gonorrhoeae y *Chlamydia trachomatis*. Entre las ITS, las infecciones causadas por VPH se consideran la causa principal que incrementa la probabilidad de padecer cáncer de cuello de útero, pero se debe también considerar que muchas de las infecciones son mixtas (coinfecciones con otras ITS) y que responden a ciertos comportamientos sexuales particulares. Actualmente, se reconoce la importancia del diagnóstico de VPH, el conocimiento de su etiopatogenia, de su oncogénesis, pero es fundamental incluir la investigación de coinfecciones que pueden inducir reactivaciones virales en lesiones pretumorales. La significativa incidencia y la prevalencia de ITS, que se puede explicar por el cambio que ha tenido la conducta sexual en los últimos años, exige una mayor consideración. Este es un fenómeno globalizado relacionado con el inicio precoz de las relaciones sexuales y con la promiscuidad en ambos sexos, lo que trae aparejado un mayor número de parejas sexuales y, por ende, mayor transmisión de infecciones²⁸⁵.

Cuando se analizan los antecedentes obstétricos, y en especial el aborto, se observó que estuvo presente en un 50 % de las mujeres con LSIL-lesión (CIN1) y en un 33,3 % con ASC-US. Si bien se trata de un bajo número de pacientes, 4 de 9 realizaron una interrupción del embarazo; como consecuencia probable, queda un epitelio de cuello uterino erosionado, que puede estar relacionado con la displasia, o ser la puerta de entrada o la causa de reactivación del VPH²⁸⁶.

Si bien el número de embarazos no representó un antecedente relevante en este grupo de estudio, es importante considerar que los embarazos llegados a término también constituyen un riesgo, sobre todo en mujeres con más de 3 a 5 hijos. Estudios han demostrado que las mujeres con 2 hijos o más tienen un riesgo mayor respecto de las nulíparas de presentar lesión intraepitelial; luego de 4 hijos ese riesgo se triplica, después de 7 se cuadriplica y con 12 aumenta en 5 veces²⁸⁷.

La mujer embarazada posee cierto grado de inmunosupresión, además del estado hormonal necesario para el desarrollo del feto. Esto puede ser un elemento favorecedor del desarrollo del cáncer en general, incluso en mujeres que presentan uno o más abortos, pues la función inmunológica de vigilancia sobre las células que presentan transformación neoplásica se haya igualmente deprimida durante la consecuencia del embarazo y puede ocurrir pérdida del control sobre el crecimiento de ellas²⁸⁶. Las laceraciones y los traumatismos obstétricos, que se producen en los abortos y/o en los partos, afectan las fronteras normales

y la relación entre el epitelio endocervical y el exocervical. Incluso el riesgo aumenta si el parto ocurre de forma distócica en el primer año después del inicio de la vida sexual^{286, 287}.

Seis de nueve mujeres (66,9 %) con citología alterada (L.SIL y ASC-US) correspondieron a las que han tenido su primer embarazo entre los 14 y los 17 años de edad, por lo tanto su primer parto fue antes de los 18 años e iniciaron la actividad sexual en la adolescencia temprana. Si bien es un grupo pequeño, este resultado se explicaría porque los embarazos y partos en las adolescentes, período durante el cual el epitelio está en fase de transición, incrementan su vulnerabilidad²⁸⁸.

En referencia al tabaquismo, en este estudio 8 de 9 mujeres eran fumadoras y tenían citología PAP alterada. Haverkos²⁸⁹ plantea que el hábito de fumar se asocia con una frecuencia dos veces mayor de aparición de cáncer de cuello uterino y se considera como un factor de riesgo independiente para la aparición de esta patología. El mecanismo exacto de cómo el cigarrillo puede llevar a la inducción de CIN y a cáncer de cuello uterino todavía es desconocido aunque se han formulado varias teorías o mecanismos²⁹⁰. Se han sugerido algunos mecanismos moleculares de cómo el cigarrillo puede contribuir a la carcinogénesis²⁹¹ o formar parte de esta. Uno de ellos es la exposición directa del ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células del epitelio del cuello a la nicotina y a la cotinina, y el otro es la exposición de los metabolitos resultantes de la reacción de los otros componentes del cigarrillo, como son los hidrocarbonados policíclicos aromáticos y las aminas aromáticas, lo que produce efectos potencialmente mutagénicos^{290, 291}.

El moco cervical de las fumadoras contiene cantidades medibles de los componentes del cigarrillo y sus metabolitos, tales como el Benzo(a)pireno (BaP), nicotina y sus derivados, tales como la nitrosaminas 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona²⁹². La sobrerregulación del BaP sobre la amplificación del genoma del VPH puede incrementar la probabilidad de la integración del VPH al genoma de la célula huésped²⁹³. El efecto a la exposición a la nicotina a largo plazo podría afectar la proliferación celular, inhibir la apoptosis y estimular el VEGF con incremento de la microvascularidad.

Otros mecanismos que pueden explicar la carcinogénesis del cáncer de cuello relacionada al cigarrillo serían las anormalidades en los sistemas inmunes sistémico y celular de la fumadora, que incluyen un desbalance sistémico sobre la producción de pro- y anticitoquinas inflamatorias, elevado número de linfocitos T supresores/tóxicos,

supresión de la actividad de los linfocitos T, disminución del número de los linfocitos T helper, disminución del número de los linfocitos killer naturales y niveles bajos de otras inmunoglobulinas diferentes a la E²⁹⁴.

Por último, al evaluar antecedentes familiares de cáncer de cuello uterino, 8 de 9 de las mujeres estudiadas con citología alterada (LSIL-lesión/CIN1 y ASC-US) señalaron tener o haber tenido un familiar con esta neoplasia.

El virus del papiloma humano es un importante factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino. Como solo algunas mujeres infectadas desarrollan cáncer, otros factores deben ser importantes para el desarrollo de la enfermedad. Los estudios epidemiológicos genéticos muestran que los factores genéticos contribuyen significativamente al riesgo de enfermedad. La susceptibilidad genética a la exposición y/o a la infección del VPH parece ser importante para determinar el riesgo individual de desarrollar este tipo de cáncer inducido por virus²⁹⁵. En este sentido, es importante el haplotipo HLA (*Human leukocyte antigen*) de las mujeres, que puede favorecer o no la presentación antigénica de proteínas virales en las células infectadas²⁹⁶. Los polimorfismos de HLA al afectar la respuesta inmune frente al virus tienen un papel importante en la susceptibilidad a las lesiones producidas por el VPH²⁹⁶.

CONCLUSIONES

- Del relevamiento epidemiológico podemos concluir que esta pequeña localidad de Santa Fe muestra una realidad social que no difiere demasiado de jurisdicciones relegadas de nuestro país. Se destacan como datos preocupantes: la temprana edad de inicio de actividad sexual, patrones de fecundidad adolescente, antecedente notable de abortos espontáneos, antecedente considerable de ITS y elevado porcentaje de fumadoras. En base a nuestros datos, se debe enfatizar la necesidad de mejorar la calidad de las instancias de atención y consejería en salud sexual y reproductiva.
- Cerca de un 50% de las pacientes asintomáticas evaluadas en este estudio presentaron estadios de disfunción vaginal, motivo por el cual resulta imprescindible el estudio morfológico del contenido vaginal independientemente de la presencia de síntomas con el fin de detectar la disfunción vaginal.
- Respecto de la influencia de los métodos anticonceptivos, es de destacar que los anticonceptivos orales combinados disminuyeron la frecuencia de vaginosis bacteriana y corrigieron otros EVBs alterados, lo que señala una tendencia positiva de protección, favoreciendo la presencia de una microbiota vaginal saludable. Aunque se trate de un factor “externo”, en realidad constituye un regulador directo del mecanismo hormonal y, por lo tanto, confirma la hipótesis del factor estrógeno en la frecuencia de la disfunción vaginal
- El uso del ACO combinado favoreció la colonización por levaduras en las mujeres sanas, ya que se detectaron tanto después de tres como de seis meses nuevas portadoras de levaduras, pero solo aproximadamente un 50 % con RIV. Aun así, no se puede descartar que esta colonización represente un factor predisponente para la vulvovaginitis recurrente.
- El uso de preservativos masculinos se asoció a un incremento de contenidos vaginales con RIV. Probablemente se relaciona al contacto del látex o de los espermicidas con una mucosa vulvar no queratinizada y humedad que favorece la penetración de agentes irritantes y alérgenos.

- Con respecto a la influencia del método del ritmo, aunque es actualmente considerado uno de los métodos menos elegidos, el microambiente vaginal de estas mujeres se encuentra exclusivamente bajo la influencia hormonal sistémica en la etapa ovulatoria, que favorece el desarrollo de los lactobacilos. Además, en el período de abstinencia sexual prolongada no hay exposición local al semen y a leucocitos como modificadores del microambiente. Sin embargo, sería necesario incrementar el tamaño muestral para confirmar estos hallazgos.
- De la comparación en la identificación de los lactobacilos utilizando MALDI-TOF MS con Rep-PCR *genomic fingerprinting*, el excelente grado de concordancia obtenido califica a la espectrometría de masa como una herramienta confiable y rápida que puede ser implementada en la práctica clínica para caracterizar las especies de lactobacilos vaginales.
- La distribución de especies de lactobacilos obtenida en este trabajo fue coincidente con reportes que relacionan una microbiota normal con lactobacilos, principalmente *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri* como dominantes. La asociación detectada en el grupo ACO con *L. crispatus*, especie protectora de la disfunción vaginal, ha marcado una relación hormonal, principalmente estrógenica, que favoreció la presencia de una microbiota vaginal saludable que permitiría reducir el uso indiscriminado de tratamiento antimicrobiano. El hallazgo por primera vez de *L. murinus* en vagina humana podría reflejar la influencia geográfica sobre la microbiota colonizante.
- En relación con el estudio citológico cervical, a pesar del tamaño de este subgrupo, los factores de riesgo analizados (antecedentes de ITS, antecedentes obstétricos, partos en la adolescencia, hábito de fumar y susceptibilidad genética) se mostraron vinculados, en una importante proporción, con LSIL-lesión/CIN1 y ASC-US. Estos resultados los clasifica como probables cofactores del VPH, y marcan la importancia de su evaluación en la génesis del cáncer de cuello uterino. Se detectó una asociación entre disfunción vaginal y citologías cervicales alteradas.



BIBLIOGRAFIA

1. Stenberg SS. Histology for Pathologist. 2° ed. Philadelphia Lippincot Raven Publishers; 1997.
2. Laterjet M, Ruiz Liard A. Anatomía Humana. Buenos Aires. Editorial Médica Panamerica; 1983.
3. Rouviered H, Delmas A. Anatomian Humana descriptiva, topográfica y funcional. 10° ed. Paris: Masson; 1999
4. Kurman RJ, Blaustein`s. Pathology of the female genital tract.3° ed. New York: Springer-Verlag; 2002.
5. Geneser F. Histología. 3° ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana; 2003.
6. Tatti S. Colposcopía y Patologías del tracto genital inferior en la era de la vacunación. 1° ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana; 2008.
7. Hoyle, C. H., Stones, R. W., Robson, T., Whitley, K., & Burnstock, G. (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide-containing nerves. *Journal of anatomy*, 188(Pt 3), 633-644
8. Levin, R. J. (2004). Measuring female genital functions—a research essential but still a clinical luxury?. *Sexual and Relationship Therapy*, 19(2), 191-200.
9. Gorodeski, G. I., Hopfer, U., Liu, C. C., & Margles, E. (2005). Estrogen acidifies vaginal pH by up-regulation of proton secretion via the apical membrane of vaginal-ectocervical epithelial cells. *Endocrinology*, 146(2), 816-824.
10. Huggyns, G.R., Preti, G. (1981). Vaginal odors and secretions. *Clin Obstet Gynecol*, 24(2):355-377.
11. Boskey, E. R., Telsch, K. M., Whaley, K. J., Moench, T. R., & Cone, R. A. (1999). Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infection and immunity*, 67(10), 5170-5175.
12. Cole, A. M. (2006). Innate Host Defense of Human Vaginal and CervicalMucosae. In *Antimicrobial Peptides and Human Disease* (pp. 199-230). Springer, Berlin, Heidelberg.
13. Paavonen, J. O. R. M. A. (1983). Physiology and ecology of the vagina. *Scand J Infect Dis Suppl*, 40, 31-35.
14. Moghissi, K. S. (1976). Postcoital test: physiologic basis, technique, and interpretation. *Fertility and Sterility*, 27(2), 117-129.
15. Wiggins, R., Hicks, S. J., Soothill, P. W., Millar, M. R., & Corfield, A. P. (2001). Mucinasas and sialidasas: their role in the pathogenesis of sexually transmitted

- infections in the female genital tract. *Sexually transmitted infections*, 77(6), 402-408.
16. Andersch-Björkman, Y., Thomsson, K. A., Larsson, J. M. H., Ekerhovd, E., & Hansson, G. C. (2007). Large scale identification of proteins, mucins, and their O-glycosylation in the endocervical mucus during the menstrual cycle. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(4), 708-716.
 17. Wickström, C., Davies, J. R., Eriksen, G. V., Veerman, E. C., & Carlstedt, I. (1998). MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochemical Journal*, 334(Pt 3), 685-693.
 18. Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S., Moccia, R., Zhan, Q., Toribara, N., Ho, S. B., ... & Hill III, J. A. (1999). MUC4 and MUC5B transcripts are the prevalent mucin messenger ribonucleic acids of the human endocervix. *Biology of reproduction*, 60(1), 58-64.
 19. Holmes KK. Sexually transmitted diseases. 3rd edition. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 1999
 20. Castellero L Figueroa Y. Fisiología del Sistema Endocrino 2ª edición. Panamá Tresguerres JA. , 2009: 1044-1056.
 21. Hans FN. Citodiagnóstico Ginecológico. 1º edición .Buenos Aires Médica Paramericana 2004.
 22. Jensen, E. V. (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progr Hormone Res*, 18, 387-414.
 23. Toft, D., & Gorski, J. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 55(6), 1574-1581.
 24. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J A. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(12): 5925-5930.
 25. Ignar-Trowbridge, D. M., Nelson, K. G., Bidwell, M. C., Curtis, S. W., Washburn, T. F., McLachlan, J. A., & Korach, K. S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(10), 4658-4662.
 26. Pietras, R. J., Arboleda, J., Reese, D. M., Wongvipat, N., Pegram, M. D., Ramos, L., ... & Slamon, D. J. (1995). HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor

- and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene*, *10*(12), 2435-2446.
27. Freedman, L. P. (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocrine reviews*, *13*(2), 129-145.
 28. Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, *240*(4854), 889-895.
 29. Beato, M., Chávez, S., & Truss, M. (1996). Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*, *61*(4), 240-251.
 30. Russell, K. S., Haynes, M. P., Sinha, D., Clerisme, E., & Bender, J. R. (2000). Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(11), 5930-5935.
 31. Klein-Hitpaß, L., Schorpp, M., Wagner, U., & Ryffel, G. U. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*, *46*(7), 1053-1061.
 32. Lieberman, B. A. (1997). The estrogen receptor activity cycle: dependence on multiple protein-protein interactions. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, *7*(1-2).
 33. Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., & Wehling, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological reviews*, *52*(4), 513-556.
 34. Domino, S. E., Hurd, E. A., Thomsson, K. A., Karnak, D. M., Larsson, J. M. H., Thomsson, E., ... & Hansson, G. C. (2009). Cervical mucins carry α (1, 2) fucosylated glycans that partly protect from experimental vaginal candidiasis. *Glycoconjugate journal*, *26*(9), 1125-1134.
 35. Ming, L., Xiaoling, P., Yan, L., Lili, W., Qi, W., Xiyong, Y., ... & Ning, H. (2007). Purification of antimicrobial factors from human cervical mucus. *Human reproduction*, *22*(7), 1810-1815.
 36. Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., McCulle, S. L., ... & Brotman, R. M. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(Supplement 1), 4680-4687.

37. Lai, S. K., Hida, K., Shukair, S., Wang, Y. Y., Figueiredo, A., Cone, R., ... & Hanes, J. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *Journal of virology*, *83*(21), 11196-11200.
38. Janeway C: Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th edition. New York: Garland Science; 2005.
39. Hladik, F., Sakchalathorn, P., Ballweber, L., Lentz, G., Fialkow, M., Eschenbach, D., & McElrath, M. J. (2007). Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity*, *26*(2), 257-270.
40. Seifer, D. B., Samuels, P., & Kniss, D. A. (Eds.). (2001). *The physiologic basis of gynecology and obstetrics*. Williams & Wilkins.
41. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Elsevier Health Sciences.
42. Sedlacek, T. V. (1999). Advances in the diagnosis and treatment of human papillomavirus infections. *Clinical obstetrics and gynecology*, *42*(2), 206-220.
43. Bontkes, H. J., De Gruijl, T. D., Walboomers, J. M. M., Van den Muysenberg, A. J. C., Gunther, A. W., Scheper, R. J., ... & Kummer, J. A. (1997). Assessment of cytotoxic T-lymphocyte phenotype using the specific markers granzyme B and TIA-1 in cervical neoplastic lesions. *British journal of cancer*, *76*(10), 1353-1360
44. Bloomfield, S. E., & Lopez, C. (1980). Herpes infections in the immunosuppressed host. *Ophthalmology*, *87*(12), 1226-1235.
45. Wira, C. R., Grant-Tschudy, K. S., & Crane-Godreau, M. A. (2005). Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *American journal of reproductive immunology*, *53*(2), 65-76.
46. Basso, B., Giménez, F., & López, C. (2005). IL-1b, IL-6 and IL-8 levels in gynecobstetric infections. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, *13*(4), 207-211.
47. Pudney, J., Quayle, A. J., & Anderson, D. J. (2005). Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biology of reproduction*, *73*(6), 1253-1263.
48. Mestecky, J., & Russell, M. W. (2000). Induction of mucosal immune responses in the human genital tract. *Pathogens and Disease*, *27*(4), 351-355.

49. Mestecky, J., Lamm, M. E., Ogra, P. L., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J. R., & Mayer, L. (Eds.). (2005). *Mucosal immunology*. Elsevier.
50. Horne, A. W., Stock, S. J., & King, A. E. (2008). Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction*, *135*(6), 739-749.
51. Cole, A. M., & Cole, A. L. (2008). Antimicrobial Polypeptides are Key Anti-HIV-1 Effector Molecules of Cervicovaginal Host Defense. *American journal of reproductive immunology*, *59*(1), 27-34.
52. Ulvatne, H. (2003). Antimicrobial Peptides. *American journal of clinical dermatology*, *4*(9), 591-595.
53. Taggart, C. C., Cryan, S. A., Weldon, S., Gibbons, A., Greene, C. M., Kelly, E., ... & McElvaney, N. G. (2005). Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF- κ B binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(12), 1659-1668.
54. Pillay, K., Coutoudis, A., Agadzi-Naqvi, A. K., Kuhn, L., Coovadia, H. M., & Janoff, E. N. (2001). Secretory leukocyte protease inhibitor in vaginal fluids and perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *The Journal of infectious diseases*, *183*(4), 653-656.
55. Helmig, R., Uldbjerg, N., & Ohlsson, K. (1995). Secretory leukocyte protease inhibitor in the cervical mucus and in the fetal membranes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology*, *59*(1), 95-101.
56. Novak, R. M., Donoval, B. A., Graham, P. J., Boksa, L. A., Spear, G., Hershov, R. C., ... & Landay, A. (2007). Cervicovaginal levels of lactoferrin, secretory leukocyte protease inhibitor, and RANTES and the effects of coexisting vaginoses in human immunodeficiency virus (HIV)-seronegative women with a high risk of heterosexual acquisition of HIV infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, *14*(9), 1102-1107.
57. Wira, C. R., Ghosh, M., Smith, J. M., Shen, L., Connor, R. I., Sundstrom, P., ... & Fahey, J. V. (2011). Epithelial cell secretions from the human female reproductive tract inhibit sexually transmitted pathogens and *Candida albicans* but not *Lactobacillus*. *Mucosal immunology*, *4*(3), 335.
58. Tomee, J. C., Hiemstra, P. S., Heinzl-Wieland, R., & Kauffman, H. F. (1997). Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *Journal of Infectious Diseases*, *176*(3), 740-747.

59. Fahey, J. V., & Wira, C. R. (2002). Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture. *Journal of Infectious Diseases*, 185(11), 1606-1613.
60. Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature immunology*, 7(12), 1250.
61. Pivarsci, A., Nagy, I., Koreck, A., Kis, K., Kenderessy-Szabo, A., Szell, M., ... & Kemeny, L. (2005). Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human β -defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes and Infection*, 7(9-10), 1117-1127.
62. Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327(5963), 291-295.
63. Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16-34.
64. Quayle, A. J. (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *Journal of reproductive immunology*, 57(1-2), 61-79.
65. Armstrong, M. D., & Klein, J. R. (2001). Immune-endocrine interactions of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis: integration, communication and homeostasis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 49(3), 231-237.
66. Grossman, C. J., Sholiton, L. J., & Nathan, P. (1979). Rat thymic estrogen receptor—I. Preparation, location and physicochemical properties. *Journal of steroid biochemistry*, 11(3), 1233-1240.
67. Wira, C. R., Fahey, J. V., Sentman, C. L., Pioli, P. A., & Shen, L. (2005). Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunological reviews*, 206(1), 306-335.
68. Mor, G., & Cardenas, I. (2010). The immune system in pregnancy: a unique complexity. *American journal of reproductive immunology*, 63(6), 425-433.
69. Fahey, J. V., Wright, J. A., Shen, L., Smith, J. M., Ghosh, M., Rossoll, R. M., & Wira, C. R. (2008). Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture. *Mucosal immunology*, 1(4), 317.
70. Grant, K. S., & Wira, C. R. (2003). Effect of mouse uterine stromal cells on epithelial cell transepithelial resistance (TER) and TNF α and TGF β release in culture. *Biology of reproduction*, 69(3), 1091-1098.

71. Gipson, I. K., Ho, S. B., Spurr-Michaud, S. J., Tisdale, A. S., Zhan, Q., Torlakovic, E., ... & Hill III, J. A. (1997). Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biology of reproduction*, *56*(4), 999-1011.
72. Vigil, P., Cortés, M. E., Zúñiga, A., Riquelme, J., & Ceric, F. (2009). Scanning electron and light microscopy study of the cervical mucus in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of electron microscopy*, *58*(1), 21-27.
73. Elstein, M. A. X. (1978). Functions and physical properties of mucus in the female genital tract. *British medical bulletin*, *34*(1), 83-88.
74. Starkey, P. M., Clover, L. M., & Rees, M. C. P. (1991). Variation during the menstrual cycle of immune cell populations in human endometrium. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *39*(3), 203-207.
75. Shen, R., Richter, H. E., Clements, R. H., Novak, L., Huff, K., Bimczok, D., ... & Smith, P. D. (2009). Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology*, *83*(7), 3258-3267.
76. Iijima, N., Linehan, M. M., Zamora, M., Butkus, D., Dunn, R., Kehry, M. R., ... & Iwasaki, A. (2008). Dendritic cells and B cells maximize mucosal Th1 memory response to herpes simplex virus. *Journal of Experimental Medicine*, *205*(13), 3041-3052.
77. Selsted, M. E., & Ouellette, A. J. (1995). Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends in cell biology*, *5*(3), 114-119.
78. Keller, M. J., Guzman, E., Hazrati, E., Kasowitz, A., Cheshenko, N., Wallenstein, S. ... & Hogarty, K. (2007). PRO 2000 elicits a decline in genital tract immune mediators without compromising intrinsic antimicrobial activity. *Aids*, *21*(4), 467-476.
79. Keller, M. J., Zerhouni-Layachi, B., Cheshenko, N., John, M., Hogarty, K., Kasowitz, A. ... & Herold, B. C. (2006). PRO 2000 gel inhibits HIV and herpes simplex virus infection following vaginal application: a double-blind placebo-controlled trial. *The Journal of infectious diseases*, *193*(1), 27-35.
80. Critchley, H. O., Kelly, R. W., Brenner, R. M., & Baird, D. T. (2003). Antiprogestins as a model for progesterone withdrawal. *Steroids*, *68*(10-13), 1061-1068.

81. Bazer, F. W., Spencer, T. E., & Johnson, G. A. (2009, January). Interferons and uterine receptivity. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 27, No. 01, pp. 090-102). © Thieme Medical Publishers.
82. Yeaman, G. R., Guyre, P. M., Fanger, M. W., Collins, J. E., White, H. D., Rathbun, W. ... & Wira, C. R. (1997). Unique CD8⁺ T cell-rich lymphoid aggregates in human uterine endometrium. *Journal of leukocyte biology*, 61(4), 427-435.
83. White, H. D., Crassi, K. M., Givan, A. L., Stern, J. E., Gonzalez, J. L., Memoli, V. A., ... & Wira, C. R. (1997). CD3⁺ CD8⁺ CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. *The Journal of Immunology*, 158(6), 3017-3027.
84. Sullivan D.A, & Wira C.R. (1983). Hormonal regulation of immunoglobulins in the rat uterus: uterine response to a single estradiol treatment. *Endocrinology*, 112(1), 260-268.
85. Kaushic, C., Frauendorf, E., & Wira, C. R. (1997). Polymeric immunoglobulin A receptor in the rodent female reproductive tract: influence of estradiol in the vagina and differential expression of messenger ribonucleic acid during estrous cycle. *Biology of reproduction*, 57(5), 958-966.
86. Noma, T. (2010). Helper T cell paradigm: Th17 and regulatory T cells involved in autoimmune inflammatory disorders, pathogen defense and allergic diseases. *Nihon Rinsho Men'eki Gakkai kaishi= Japanese journal of clinical immunology*, 33(5), 262-271.
87. Feinen, B., Jerse, A. E., Gaffen, S. L., & Russell, M. W. (2010). Critical role of Th17 responses in a murine model of *Neisseria gonorrhoeae* genital infection. *Mucosal immunology*, 3(3), 312.
88. Serrano, A. H. (2009). Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis. *Reumatologia clinica*, 5, 1-5.
89. Scurlock, A. M., Frazer, L. C., Andrews, C. W., O'Connell, C. M., Foote, I. P., Bailey, S. L., ... & Darville, T. (2011). Interleukin-17 contributes to generation of Th1 immunity and neutrophil recruitment during *Chlamydia muridarum* genital tract infection but is not required for macrophage influx or normal resolution of infection. *Infection and immunity*, 79(3), 1349-1362.
90. Döderlein, A. (1892). Das Scheidensekret. *Leipzig, E. Besold*.

91. Redondo-Lopez, V., Cook, R. L., & Sobel, J. D. (1990). Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Reviews of infectious diseases*, 12(5), 856-872.
92. Boris, S., & Barbés, C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and infection*, 2(5), 543-546.
93. Zoetendel, E. G., Vaughan, E. E., & De Vos, W. M. (2006). A microbial world within us. *Molecular Microbiology*, 59, 1639-1650.
94. Alvarez-Olmos, M. I., Barousse, M. M., Rajan, L., Van Der Pol, B. J., Fortenberry, D., Orr, D., & Fidel Jr, P. L. (2004). Vaginal lactobacilli in adolescents: presence and relationship to local and systemic immunity, and to bacterial vaginosis. *Sexually transmitted diseases*, 31(7), 393-400.
95. Matsumiya, Y., Kato, N., Watanabe, K., & Kato, H. (2002). Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal Lactobacillus species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Journal of infection and chemotherapy*, 8(1), 43-49.
96. Salminen S. Deighton MA, Benno Y, Gorbach SL. Lactic acid bacteria in health and disease. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects, Salminen, S. y von Wright, A. (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A. 1998; 211- 53.
97. Doderlein A. Das scheidensekret und seine bedeutung für puerperalfieber. *Zbl Bakteriol* 1892;11:699
98. Thomas S. Doderlein's Bacillus: Lactobacillus Acidophilus. *J Infect Dis.* 1928; 43:218-227.
99. Lauer, E., Helming, C., & Kandler, O. (1980). Heterogeneity of the species Lactobacillus acidophilus (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridisation. *Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 1(2), 150-168.
100. Johnson, J. L., Phelps, C. F., Cummins, C. S., London, J., & Gasser, F. (1980). Taxonomy of the Lactobacillus acidophilus group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30(1), 53-68.
101. Schleifer, K. H., & Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus Lactobacillus and related genera. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), 461-467.

102. Falsen, E., Pascual, C., Sjöden, B., Ohlén, M., & Collins, M. D. (1999). Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 217-221.
103. Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 41(2), 103-125.
104. Zhong, W., Millsap, K., Bialkowska-Hobrzanska, H., & Reid, G. (1998). Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. *Applied and environmental microbiology*, 64(7), 2418-2423.
105. Jakobsson, T., & Forsum, U. (2007). *Lactobacillus iners*: a marker of changes in the vaginal flora?. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 3145-3145.
106. Wylie, J. G., & Henderson, A. (1969). Identity and glycogen-fermenting ability of lactobacilli isolated from the vagina of pregnant women. *Journal of medical microbiology*, 2(3), 363-366.
107. Boyd, M. A., Antonio, M. A., & Hillier, S. L. (2005). Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. *Journal of clinical microbiology*, 43(10), 5309-5311.
108. Vallor, A. C., Antonio, M. A., Hawes, S. E., & Hillier, S. L. (2001). Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *The Journal of infectious diseases*, 184(11), 1431-1436.
109. Zhou, X., Bent, S. J., Schneider, M. G., Davis, C. C., Islam, M. R., & Forney, L. J. (2004). Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*, 150(8), 2565-2573.
110. Ferris, M. J., Norori, J., Zozaya-Hinchliffe, M., & Martin, D. H. (2007). Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment. *Journal of clinical microbiology*, 45(3), 1016-1018.
111. Lamont, R. F., Sobel, J. D., Akins, R. A., Hassan, S. S., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J. P., & Romero, R. (2011). The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 118(5), 533-549.

112. Nugent, R. P., Krohn, M. A., & Hillier, S. L. (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of clinical microbiology*, 29(2), 297-301.
113. Proyecto BACOVA, Programa PROSAR, Fundación Bioquímica Argentina. Manual de Procedimientos BACOVA Junio 2012. Disponible en : <http://www.fba.org.ar/programas/prosar/manual-procedimiento-bacova-26-6-2012.pdf>
114. Vásquez, A., Jakobsson, T., Ahrné, S., Forsum, U., & Molin, G. (2002). Vaginal Lactobacillus flora of healthy Swedish women. *Journal of clinical microbiology*, 40(8), 2746-2749.
115. Tärnberg, M., Jakobsson, T., Jonasson, J., & Forsum, U. (2002). Identification of randomly selected colonies of lactobacilli from normal vaginal fluid by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions. *Apmis*, 110(11), 802-810.
116. Yamamoto, T., Zhou, X., Williams, C. J., Hochwalt, A., & Forney, L. J. (2009). Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*, 22(1), 11-18.
117. Morse SA, Butel JS. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 23. New York: McGraw Hill; 1995.
118. Verhelst, R., Verstraelen, H., Claeys, G., Verschraegen, G., Delanghe, J., Van Simaey, L.,... & Vanechoutte, M. (2004). Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC microbiology*, 4(1), 16.
119. Hyman, R. W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Giudice, L. C., & Davis, R. W. (2005). Microbes on the human vaginal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(22), 7952-7957.
120. Anukam, K. C., Osazuwa, E. O., Ahonkhai, I., & Reid, G. (2006). Lactobacillus vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city, Nigeria. *Sexually transmitted diseases*, 33(1), 59-62.
121. 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.
122. Smith, W. L., Hedges, S. R., Mordechai, E., Adelson, M. E., Trama, J. P., Gyax, S. E., ... & Hilbert, D. W. (2014). Cervical and vaginal flora specimens are highly concordant with respect to bacterial vaginosis-associated organisms and commensal lactobacillus species in women of reproductive age. *Journal of clinical microbiology*, 52(8), 3078-3081.
123. Srinivasan, S., Liu, C., Mitchell, C. M., Fiedler, T. L., Thomas, K. K., Agnew, K. J. ... & Fredricks, D. N. (2010). Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PloS one*, 5(4), e10197.
124. Smith, T. (1934). *Parasitism and disease*. Princeton University Press; Princeton.
125. Soler, O. C. O., Castaño, R., Copolillo, E., Kwiatkowski, L., Lotoczko, V., ... & Leonino, A. P. (2010). Guía práctica integral (clínica-laboratorio) de diagnóstico de vaginosis-vaginitis en la atención primaria de la mujer en edad fértil. *Acta Bioquim Clin Latinoam*, 44(3), 359-369.
126. Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Klebanoff, S. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M., & Holmes, K. K. (1989). Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of clinical microbiology*, 27(2), 251-256.
127. Amsel, R., Totten, P. A., Spiegel, C. A., Chen, K. C., Eschenbach, D., & Holmes, K. K. (1983). Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *The American journal of medicine*, 74(1), 14-22.
128. Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., & Marrazzo, J. M. (2005). Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *New England Journal of Medicine*, 353(18), 1899-1911.
129. Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., Thomas, K. K., Oakley, B. B., & Marrazzo, J. M. (2007). Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *Journal of clinical microbiology*, 45(10), 3270-3276.
130. Xia, Q., Cheng, L., Zhang, H., Sun, S., Liu, F., Li, H. ... & Diao, Y. (2016). Identification of vaginal bacteria diversity and its association with clinically diagnosed bacterial vaginosis by denaturing gradient gel electrophoresis and correspondence analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, 44, 479-486.

131. Swidsinski, A., Mendling, W., Loening-Baucke, V., Ladhoff, A., Swidsinski, S., Hale, L. P., & Lochs, H. (2005). Adherent bio films in bacterial vaginosis. *Obstetrics & Gynecology*, *106*(5, Part 1), 1013-1023.
132. Yen, S., Shafer, M. A., Moncada, J., Campbell, C. J., Flinn, S. D., & Boyer, C. B. (2003). Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-sexually experienced young women entering the military. *Obstetrics & Gynecology*, *102*(5), 927-933.
133. Fethers, K. A., Fairley, C. K., Morton, A., Hocking, J. S., Hopkins, C., Kennedy, L. J. ... & Bradshaw, C. S. (2009). Early sexual experiences and risk factors for bacterial vaginosis. *The Journal of infectious diseases*, *200*(11), 1662-1670.
134. Fethers, K. A., Fairley, C. K., Hocking, J. S., Gurrin, L. C., & Bradshaw, C. S. (2008). Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, *47*(11), 1426-1435.
135. Skinner, C. J., Stokes, J., Kirlew, Y., Kavanagh, J., & Forster, G. E. (1996). A case-controlled study of the sexual health needs of lesbians. *Sexually Transmitted Infections*, *72*(4), 277-280.
136. Fethers, K., Marks, C., Mindel, A., & Estcourt, C. S. (2000). Sexually transmitted infections and risk behaviours in women who have sex with women. *Sexually Transmitted Infections*, *76*(5), 345-349.
137. Ness, R. B., Hillier, S. L., Richter, H. E., Soper, D. E., Stamm, C., McGregor, J., ... & Rice, P. (2002). Douching in relation to bacterial vaginosis, lactobacilli, and facultative bacteria in the vaginal. *Obstetrics & Gynecology*, *100*(4), 765-772.
138. Schwebke, J. R., Desmond, R. A., & Oh, M. K. (2004). Predictors of bacterial vaginosis in adolescent women who douche. *Sexually transmitted diseases*, *31*(7), 433-436.
139. Joesoef, M. R., Karundeng, A., Runtupalit, C., Moran, J. S., Lewis, J. S., & Ryan, C. A. (2001). High rate of bacterial vaginosis among women with intrauterine devices in Manado, Indonesia. *Contraception*, *64*(3), 169-172.
140. Georgijević, A., Cjukić-Ivancević, S., Bujko, M. (2000). Bacterial vaginosis. Epidemiology and risk factors. *Srp Arh Celok Lek*, *128*: 29-33
141. Klebanoff, M. A., Nansel, T. R., Brotman, R. M., Zhang, J., Yu, K. F., Schwebke, J. R., & Andrews, W. W. (2010). Personal hygienic behaviors and bacterial vaginosis. *Sexually transmitted diseases*, *37*(2), 94.

142. Verstraelen, H., Verhelst, R., Nuytinck, L., Roelens, K., De Meester, E., De Vos, D., ... & Vaneechoutte, M. (2009). Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*. *Journal of reproductive immunology*, 79(2), 163-173.
143. Klebanoff, M. A., Schwebke, J. R., Zhang, J., Nansel, T. R., Yu, K. F., & Andrews, W. W. (2004). Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstetrics & Gynecology*, 104(2), 267-272.
144. Marrazzo, J. M., Wiesenfeld, H. C., Murray, P. J., Busse, B., Meyn, L., Krohn, M., & Hillier, S. L. (2006). Risk factors for cervicitis among women with bacterial vaginosis. *The Journal of infectious diseases*, 193(5), 617-624.
145. Donders, G. G., Vereecken, A., Bosmans, E., Dekeersmaecker, A., Salembier, G., & Spitz, B. (2002). Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 109(1), 34-43.
146. Ness, R. B., Kip, K. E., Hillier, S. L., Soper, D. E., Stamm, C. A., Sweet, R. L., ... & Richter, H. E. (2005). A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. *American journal of epidemiology*, 162(6), 585-590.
147. Plass, E.B., Hesseltine, H.C., Borts, I.H. (1931). Case-report vulvovaginal infection due to *Candida albicans*. *Am J Obstet Gynecol*. 21: 320-322.
148. González-Pedraza Avilés, A., Ortiz Zaragoza, C., Dávila Mendoza, R., & Valencia Gómez, C. M. (2007). Infecciones cervicovaginales más frecuentes: prevalencia y factores de riesgo. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 33(2), 1-12.
149. Hurley, R. (1981). Recurrent *Candida* infection. *Clin Obstet Gynecol*, 8: 209-13.
150. Buscemi, L., Arechavala, A., & Negroni, R. (2004). Estudio de vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas con especial referencia a la candidiasis en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz. *Rev Iberoam Micol*, 21(1), 177-181.
151. Sobel JD. *Candida* vulvovaginitis. *Sem Dermatol*, 1996; 15: 17-28.
152. Sobel, J. D. (1985). Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 152(7), 924-935.
153. Ferrer, J. (2000). Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 71(S1), 21-27.

154. Fosch, S. E., Yones, C., Trossero, M., Grosso, O., & Perazzi, B. (2015). Influence of contraception on basic vaginal states: A prospective study. *Health*, 7(02), 238.
155. Aznar J, Blanco M, Lepe J, Otero L, Vázquez F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. 2007. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
156. Estrada-Barraza, D., Martínez, A. D., Flores-Padilla, L., Mendoza-De Elias, R., & Sánchez-Vargas, L. O. (2011). Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de Candida en aislamientos clínicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(1), 36-42.
157. Lossick JC. Epidemiology of urogenital trichomoniasis. In: Honigberg BM, ed. *Trichomonads parasitic in humans*. New York: Springer-Verlag, 1990:311-323.
158. Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 300-317.
159. Kissinger, P. (2015). *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC infectious diseases*, 15(1), 307.
160. Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., ... & Alary, M. (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS (London, England)*, 7(1), 95-102.
161. Soper, D. E., Bump, R. C., & Hurt, W. G. (1990). Bacterial vaginosis and trichomoniasis vaginitis are risk factors for cuff cellulitis after abdominal hysterectomy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 163(3), 1016-1021.
162. Muñoz-Ramírez, A., López-Monteón, A., Ramos-Ligonio, A., Méndez-Bolaina, E., & Guapillo-Vargas, M. R. (2018). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* and Human papillomavirus in female sex workers in Central Veracruz, Mexico. *Revista Argentina de microbiología*.
163. Campbell, D. Diagnosis of trichomoniasis. Comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens: Krieger JN, Tam MR, Stevens C. Diagnosis of trichomoniasis:

- comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens. *JAMA* 1988;259:1223-1227
- 164.Hammill, H.A. (1989) *Trichomonas vaginalis*. *Obstet. Gynecol. Clin.North Am.* 16, 531–540
- 165.Lord, E., Newnham, T., Dorrell, L., Jesuthasan, G., Clarke, L., Jeffery, K., & Sherrard, J. (2017). Detecting asymptomatic *Trichomonas vaginalis* in females using the BD ProbeTec™ *Trichomonas vaginalis* Qx nucleic acid amplification test. *International journal of STD & AIDS*, 28(4), 357-361.
- 166.Perazzi, B., Menghi, C., Coppolillo, E., Gatta, C., Cora Eliseht, M., Vay, C., ... & Famiglietti, A. (2007). Investigación de *Trichomonas vaginalis* durante el embarazo mediante diferentes metodologías. *Revista argentina de microbiología*, 39(2), 99-104.
- 167.DeMeo, L. R., Draper, D. L., McGregor, J. A., Moore, D. F., Peter, C. R., Kapernick, P. S., & McCormack, W. M. (1996). Evaluation of a deoxyribonucleic acid probe for the detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal secretions. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 174(4), 1339-1342.
- 168.Radonjic, I. V., Dzamic, A. M., Mitrovic, S. M., Arsenijevic, V. S. A., Popadic, D. M., & Zec, I. F. K. (2006). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection: the sensitivities and specificities of microscopy, culture and PCR assay. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 126(1), 116-120.
- 169.Madico, G., Quinn, T. C., Rompalo, A., McKee, K. T., & Gaydos, C. A. (1998). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection by PCR Using Vaginal Swab Samples. *Journal of clinical microbiology*, 36(11), 3205-3210.
- 170.Testardini, P., Vaulet, M. L. G., Entrocassi, A. C., Menghi, C., Eliseht, M. C., Gatta, C.,... & Tatti, S. (2016). Optimization of *Trichomonas vaginalis* diagnosis during pregnancy at a University Hospital, Argentina. *The Korean journal of parasitology*, 54(2), 191.
- 171.Rodríguez-Iglesias, M. (2012). Diagnóstico molecular del papilomavirus humano: nuevos desafíos en un escenario diferente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(5), 223-224.
- 172.Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International journal of cancer*, 118(12), 3030-3044.

173. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H. ... & Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer*, 49(6), 1374-1403.
174. Zhang, L., Wu, J., Ling, M. T., Zhao, L., & Zhao, K. N. (2015). The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses. *Molecular cancer*, 14(1), 87.
175. Almonte, M., Albero, G., Molano, M., Carcamo, C., García, P. J., & Pérez, G. (2008). Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*, 26, L16-L36.
176. Palaoro, L. A., Rocher, A. E., & de Torres, R. (2013). Respuesta inflamatoria genital en la detección de alteraciones por virus del papiloma humano. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 47(3), Recuperado en julio de 2018, disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032529572013000300009&lng=es.
177. Feichtinger, W., Spona, J., Elstein, M., Lüdicke, F., Müller, U., & Williams, C. (1994). A comparison of the effects of two monophasic low dose oral contraceptives on the inhibition of ovulation. *Advances in contraception*, 10(1), 5-18.
178. Stubblefield PG: Family planning. En: Berek JS, Adashi EY, Hillard PA (eds). *Novak's Gynecology*. Baltimore: Williams & Wilkins 1996; 227-278
179. Gaspard, U. J., Dubois, M., Gillain, D., Franchimont, P., & Duvivier, J. (1984). Ovarian function is effectively inhibited by a low-dose triphasic oral contraceptive containing ethinylestradiol and levonorgestrel. *Contraception*, 29(4), 305-318.
180. Gupta, K., Hillier, S. L., Hooton, T. M., Roberts, P. L., & Stamm, W. E. (2000). Effects of contraceptive method on the vaginal microbial flora: a prospective evaluation. *The Journal of infectious diseases*, 181(2), 595-601.
181. Tibaldi, C., Cappello, N., Latino, M. A., Masuelli, G., Marini, S., & Benedetto, C. (2009). Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: risk factors and rates of occurrence. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(7), 670-679.
182. Vodstrcil, L. A., Hocking, J. S., Law, M., Walker, S., Tabrizi, S. N., Fairley, C. K., & Bradshaw, C. S. (2013). Hormonal contraception is associated with a reduced risk

- of bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 8(9), e73055.
183. Sivin, I., & Stern, J. (1979). Long-acting, more effective copper T IUDs: a summary of US experience, 1970-75. *Studies in Family Planning*, 10(10), 263-281.
184. Tatum, H. J. (1972). Intrauterine contraception. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 112(7), 1000-1023.
185. UNDP/UNFPA/WHO/World Bank Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. Long term reversible contraception twelve years of experience with the TCU380A and TCU220C. *Contraception* 1997; 56:341-352.
186. Mishell Jr, D. R. (1998). Intrauterine devices: mechanisms of action, safety, and efficacy. *Contraception*, 58(3), 45S-53S.
187. Sastrawinata, S., Farr, G., Prihadi, S. M., Hutapea, H., Anwar, M., Wahyudi, I., ... & Robbins, M. (1991). A comparative clinical trial of the TCU 380A, Lippes Loop D and Multiload Cu 375 IUDs in Indonesia. *Contraception*, 44(2), 141-154.
188. Shoubnikova, M., Hellberg, D., Nilsson, S., & Mårdh, P. A. (1997). Contraceptive use in women with bacterial vaginosis. *Contraception*, 55(6), 355-358.
189. Moi, H. (1990). Prevalence of bacterial vaginosis and its association with genital infections, inflammation, and contraceptive methods in women attending sexually transmitted disease and primary health clinics. *International journal of STD & AIDS*, 1(2), 86-94.
190. Demirezen, Ş., Küçük, A., & Beksaç, M. S. (2006). The association between copper containing IUCD and bacterial vaginosis. *Central European journal of public health*, 14(3).
191. Discacciati, M. G., Hidalgo, M., & Bahamondes, L. (2008). Cytological evaluation and investigation of the vaginal flora of long-term users of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (LNG-IUS). *Contraception*, 77(1), 30-33.
192. Donders, G. G., Berger, J., Heuninckx, H., Bellen, G., & Cornelis, A. (2011). Vaginal flora changes on Pap smears after insertion of levonorgestrel-releasing intrauterine device. *Contraception*, 83(4), 352-356.
193. Avonts, D., Sercu, M., Heyerick, P., Vandermeeren, I., Meheus, A., & Piot, P. (1990). Incidence of uncomplicated genital infections in women using oral

- contraception or an intrauterine device: a prospective study. *Sexually transmitted diseases*, 17(1), 23-29.
194. Achilles, S. L., Austin, M. N., Meyn, L. A., Mhlanga, F., Chirenje, Z. M., & Hillier, S. L. (2018). Impact of contraceptive initiation on vaginal microbiota. *American journal of obstetrics and gynecology*, 218(6), 622-e1.
195. Pérez García, I., Pérez Campos, E. F., & Plá Ernst, E. (2005). Métodos de anticoncepción en adolescentes. Píldora de emergencia. Aspectos ético-legales. *Revista pediatría de atención primaria*, 7(Supl 1), 81-87.
196. Gallo MF, Grimes DA, Lopez LM, Schulz KF. Preservativos masculinos sin látex versus preservativos masculinos con látex como método anticonceptivo (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus, número 3*, 2008. Oxford, Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de *The Cochrane Library*, Issue. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
197. Schreiber, C. A., Meyn, L. A., Creinin, M. D., Barnhart, K. T., & Hillier, S. L. (2006). Effects of long-term use of nonoxynol-9 on vaginal flora. *Obstetrics and gynecology*, 107(1), 136.
198. Moraes PS, Taketomi EA. (2000). Allergic vulvovaginitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 85: 253-265.
199. Ramirez De Knott, H. M., McCormick, T. S., Do, S. O., Goodman, W., Ghannoum, M. A., Cooper, K. D., & Nedorost, S. T. (2005). Cutaneous hypersensitivity to *Candida albicans* in idiopathic vulvodynia. *Contact Dermatitis*, 53(4), 214-218.
200. Coll C, Ramírez IM, Martínez F, Ramírez A, Bernabeu S, Díaz E. Anticoncepción en la adolescencia. Métodos de barrera, naturales y DIU. En: Buil C, Lete I, Ros R, De Pablo JL. Manual de salud reproductiva en la adolescencia. Aspectos básicos y clínicos. Zaragoza: Editorial Wyeth-Lederle; 2001.p.729-771.
201. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, (oms/who) Blithe (Center for Health and Medical Education), Educación en fertilidad familiar. Materiales para la enseñanza sobre los métodos de planificación familiar natural, dirigidos a educadores. Ginebra.
202. Hilgers T.W., Abraham G.E., Cavanagh D. (1978) Natural Family Planning – I. The peak symptom and estimated time of ovulation. *Obstet. Gynecol.* 52: 575-582.
203. Vessey, M., Lawless, M., & Yeates, D. (1982). Efficacy of different contraceptive methods. *The Lancet*, 319(8276), 841-842.

204. Turovskiy, Y., Sutyak Noll, K., & Chikindas, M. L. (2011). The aetiology of bacterial vaginosis. *Journal of applied microbiology*, 110(5), 1105-1128.
205. Fuster, I. S. (1999). "Double Dutch" or double protection. *Diálogos*, 20(40), 20-22.
206. Martínez J, Serrano I, Doval JL. Anticoncepción hormonal oral en jóvenes II: atención contraceptiva, prescripción, AHO y ETS. En: Álvarez D, Álvarez de Sotomayor, Balasch B, Barranco E, Bernabeu S, et al. Manual de anticoncepción hormonal. Madrid: Ed. SEC; 2005:263-273.
207. HUMANOS, D. U. D. D. (1948). Naciones Unidas.-DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DEL NIÑO (1959, 20 de noviembre), Naciones Unidas.-Convención sobre los Derechos del Niño adoptada por la Asamblea General de las Naciones Unidas. *Nueva York el, 20*, 11-89.
208. Naciones Unidas. (1948). Declaración Universal de los Derechos Humanos. Resolución 217 A (III) Artículo 25-2; París.
209. Naciones Unidas. (1994) Informe de la Conferencia Internacional sobre la Población y el Desarrollo. cap. I, resolución 1 S.95.XIII.18; El Cairo.
210. OMS/UNICEF/UNFFA. (2004) Examen del Comité de Coordinación en Materia de Salud. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo y el Fondo de Población de las Naciones Unidas, Nueva York.
211. Naciones Unidas.(1999).Medidas clave para seguir ejecutando el Programa de Acción de la Conferencia Internacional sobre la Población y el Desarrollo, S-21/2:14 – 18; Nueva York.
212. World Health Organization-UNICEF-UNFPA. (1990 to 2008, 2010). The World Bank-. Trends in Maternal Mortality; Geneva, Switzerland.
213. Guttmacher Institute, Facts on Investing in Family Planning and Maternal and Child Health; New York: Guttmacher Institute, 2010.
214. Hogan, M. C., Foreman, K. J., Naghavi, M., Ahn, S. Y., Wang, M., Makela, S. M., & Murray, C. J. (2010). Maternal mortality for 181 countries, 1980–2008: a systematic analysis of progress towards Millennium Development Goal 5. *The lancet*, 375(9726), 1609-1623.
215. UNAIDS and World Health Organization (2008). Global Report of the AIDS Epidemic. 2008; Geneva, Switzerland.

216. AbAbdool-Karim, Q., AbouZahr, C., Dehne, K., Mangiaterra, V., Moodley, J., Rollins, N. ... & de Zoysa, I. (2010). HIV and maternal mortality: turning the tide. *The Lancet*, 375(9730), 1948-1949.
217. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2001). Encuesta Nicaraguense de Demografía y Salud ENDESA., Managua.
218. Antonio, M. A., Hawes, S. E., & Hillier, S. L. (1999). The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *Journal of Infectious Diseases*, 180(6), 1950-1956.
219. Perazzi, B. E., Menghi, C. I., Coppolillo, E. F., Gatta, C., Eliseth, M. C., De Torres, R. A.,... & Famiglietti, A. M. (2010). Prevalence and comparison of diagnostic methods for *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women in Argentina. *The Korean journal of parasitology*, 48(1), 61.
220. Odds, F. C., & Bernaerts, R. I. A. (1994). CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of clinical microbiology*, 32(8), 1923-1929.
221. Jorgensen, J H., Pfaller, M. A., Carroll, K. C. , Funke, G. Landry, M. L., Richter, S. S. & Warnock, D. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington D.C. ASM Press; 2015.
222. Hammes, W. P., & Hertel, C. Family I. Lactobacillaceae. Vol. 3. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed., New York. Springer; 2009: 465-511.
223. Foschi, C., Laghi, L., Parolin, C., Giordani, B., Compri, M., Cevenini, R., ... & Vitali, B. (2017). Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and 1H-NMR. *PloS one*, 12(2), e0172483.
224. Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205(1), 31-36.
225. Kullen, M. J., Sanozky-Dawes, R. B., Crowell, D. C., & Klaenhammer, T. R. (2000). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of applied microbiology*, 89(3), 511-516.

- 226.Pospiech, A., & Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends in Genetics*, 11(6), 217-218.
- 227.Pavlova, S. I., Kilic, A. O., Kilic, S. S., So, J. S., Nader-Macias, M. E., Simoes, J. A., & Tao, L. (2002). Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *Journal of applied microbiology*, 92(3), 451-459.
- 228.Programa Nacional de Salud Sexual y Procreación Responsable -Asociación Médica Argentina de Anticoncepción (AMADA). Métodos Anticonceptivos; Guía práctica para profesionales de la Salud. PNSSyPR (2012). Disponible en www.msal.gov.ar/saludsexual.
- 229.Ministerio de Salud de la Nación (Argentina). Buenos Aires (2013). Encuesta nacional sobre Salud Sexual y Reproductiva. Disponible en : https://www.indec.gov.ar/ftp/cuadros/publicaciones/enssyr_2013.pdf
- 230.Ministerio de Salud de la Nación (Argentina). Buenos Aires (2016). Programa Nacional de Salud Integral en la Adolescencia. SITUACIÓN. Primera Edición, Disponible: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000872cnt-linea-baseadolescencia-2016.pdf>
- 231.Ministerio de Salud de la Nación (Argentina), Buenos Aires (2015) Indicadores seleccionados de salud para población de 10 a 19 años. Disponible: <http://www.deis.msal.gov.ar/wp-content/uploads/2016/12/Boletin155Adolescentes.pdf>
- 232.WHO, U. (2014). Trends in Maternal Mortality: 1990 to 2013. Estimates by WHO, UNICEF, UNFPA, World Bank and the United Nations Population Division.
- 233.Organización Mundial de la Salud, Infecciones de Transmisión sexual, cifras y datos. Centro de prensa: Nota descriptiva N°110-2016. Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
- 234.Organización Mundial de la Salud, Papiloma Virus Humano y Cáncer Cervicouterino, Centro de prensa: Nota descriptiva N°380-2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/es/>
- 235.Programa Nacional de Prveención del Cáncer Cervico Uterino. Disponible en <http://www.msal.gov.ar/cancer-cervico-uterino/default.asp>.
- 236.Ministerio de Salud de la Nación, Instituto Nacional de estadística y Censos (2015). Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo para Enfermedades No

- Transmisibles. 1ª Edición. Disponible:
http://www.msaludjujuy.gov.ar/Archi_2015%5CFact_Riesgo_Enf_No_transm.pdf
237. Lidegaard, Ø., Nielsen, L. H., Skovlund, C. W., & Løkkegaard, E. (2012). Venous thrombosis in users of non-oral hormonal contraception: follow-up study, Denmark 2001-10. *Bmj*, *344*, e2990.
238. Fosch, S., Fogolín, N., Azzaroni, E., Pairetti, N., Minacori, H., Tita, I., ... & Gribaudo, G. (2006). Vulvovaginitis: correlación con factores predisponentes, aspectos clínicos y estudios microbiológicos. *Revista argentina de microbiología*, *38*(4), 202-205.
239. Touzon, M. S., Losada, M., Eliseht, M. C., Menghi, C., Gatta, C., Santa Cruz, G., ... & Perazzi, B. (2014). Evaluación de la disfunción vaginal en mujeres embarazadas sintomáticas y asintomáticas mediante la utilización de los estados vaginales básicos (EVB) y su comparación con el estudio microbiológico convencional. *Revista argentina de microbiología*, *46*(3), 182-187.
240. Laga, M., Nzila, N., & Goeman, J. (1991). The interrelationship of sexually transmitted diseases and HIV infection: implications for the control of both epidemics in Africa. *Aids*, *5*, S55-63.
241. Alderete, J. F., Demeš, P., Gombosova, A., Valent, M., Fabusova, M., Janoska, A., ... & Arroyo, R. (1988). Specific parasitism of purified vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. *Infection and immunity*, *56*(10), 2558-2562.
242. Arroyo, R., Engbring, J., & Alderete, J. F. (1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular microbiology*, *6*(7), 853-862.
243. Atias A. Parasitología clínica. 3 ed. España: Publicaciones Técnicas Mediterraneo; 1994. p. 367-373.)
244. Donders, G. G., Bellen, G., Grinceviciene, S., Ruban, K., & Vieira-Baptista, P. (2017). Aerobic vaginitis: no longer a stranger. *Research in microbiology*, *168*(9-10), 845-858.
245. Garg, K., Khare, A., Bansal, R., Sharma, S., & Chaudhary, N. (2017). Effects of Different Contraceptive Methods on Cervico-Vaginal Cytology. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *11*(7), EC09.
246. Riggs, M., Klebanoff, M., Nansel, T., Zhang, J., Schwebke, J., & Andrews, W. (2007). Longitudinal association between hormonal contraceptives and bacterial

- vaginosis in women of reproductive age. *Sexually transmitted diseases*, 34(12), 954-959.
- 247.Fosch, S. E., Yones, C., Trossero, M., & Grosso, O. (2011). Influencia del método anticonceptivo en el perfil de la función vaginal en un microambiente social. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 45(4), 763-772.
- 248.Boskey, E. R., Cone, R. A., Whaley, K. J., & Moench, T. R. (2001). Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction*, 16(9), 1809-1813.
- 249.Fosch S.E., Ficoseco C.A., Marchesi A., Cocucci S., Nader-Macias M.E.F., Perazzi B.E.(2018). Microbiota and Identification of Vaginal Lactobacilli Using MALDI-TOF MS and 16S rDNA Sequencing. *The Open Microbiology Journal*, 12: 218-229. Electronic publication date: 29/06/2018] [Collection year: 2018] - Publisher Id: TOMICROJ-12-218] - [DOI: 10.2174/1874285801812010218]
- 250.Verstraelen, H., & Swidsinski, A. (2013). The biofilm in bacterial vaginosis: implications for epidemiology, diagnosis and treatment. *Current opinion in infectious diseases*, 26(1), 86-89.
- 251.Cotter, G., & Kavanagh, K. (2000). Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *British journal of biomedical science*, 57(3), 241.
- 252.Harwood, B., Meyn, L. A., Ballagh, S. A., Raymond, E. G., Archer, D. F., & Creinin, M. D. (2008). Cervicovaginal colposcopic lesions associated with 5 nonoxynol-9 vaginal spermicide formulations. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 198(1), 32 e 1-32 e 7
- 253.Moraes, P.S., Taketomi, E.A.(2000) Allergic vulvovaginitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 85: 253-265.
- 254.Bauer, A., Rödiger, C., Greif, C., Kaatz, M., & Elsner, P. (2005). Vulvar dermatoses—irritant and allergic contact dermatitis of the vulva. *Dermatology*, 210(2), 143-149.
- 255.Madden, T., Grentzer, J. M., Secura, G. M., Allsworth, J. E., & Peipert, J. F. (2012). Risk of bacterial vaginosis in users of the intrauterine device: a longitudinal study. *Sexually transmitted diseases*, 39(3), 217.
- 256.Aagaard, K., Riehle, K., Ma, J., Segata, N., Mistretta, T. A., Coarfa, C., ... & Gevers, D. (2012). A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PloS one*, 7(6), e36466.

- 257.Green, K. A., Zarek, S. M., & Catherino, W. H. (2015). Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract. *Fertility and sterility*, *104*(6), 1351-1357.
- 258.Singh, S., Goswami, P., Singh, R., & Heller, K. J. (2009). Application of molecular identification tools for Lactobacillus, with a focus on discrimination between closely related species: a review. *LWT-Food Science and Technology*, *42*(2), 448-457.
- 259.Callaway, A., Kostrzewa, M., Willershausen, B., Schmidt, F., Thiede, B., Kupper, H., & Kneist, S. (2013). Identification of Lactobacilli from deep carious lesions by means of species-specific PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Lab*, *59*(11-12), 1373-1379.
- 260.Angelakis, E., Million, M., Henry, M., & Raoult, D. (2011). Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of food science*, *76*(8).
- 261.Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z., & Karpíšková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International journal of food microbiology*, *159*(2), 107-114.
- 262.Anderson, A. C., Sanunu, M., Schneider, C., Clad, A., Karygianni, L., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2014). Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC microbiology*, *14*(1), 312.
- 263.Dec, M., Urban-Chmiel, R., Gnat, S., Puchalski, A., & Wernicki, A. (2014). Identification of Lactobacillus strains of goose origin using MALDI-TOF mass spectrometry and 16S–23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Research in microbiology*, *165*(3), 190-201.
- 264.Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2014; *52*:1089–1097. [View ArticlePubMedPubMed CentralGoogle Scholar](#)
- 265.Kim, T. K., Thomas, S. M., Ho, M., Sharma, S., Reich, C. I., Frank, J. A., ... & Leigh, S. R. (2009). Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals. *Journal of clinical microbiology*, *47*(4), 1181-1189.

266. Ravel, J., Brotman, R. M., Gajer, P., Ma, B., Nandy, M., Fadrosh, D. W., ... & Hickey, R. J. (2013). Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome*, *1*(1), 29.
267. Jespers, V., Menten, J., Smet, H., Poradosú, S., Abdellati, S., Verhelst, R., ... & Crucitti, T. (2012). Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC microbiology*, *12*(1), 83.
268. Shi, Y., Chen, L., Tong, J., & Xu, C. (2009). Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *35*(3), 525-532.
269. Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, *59*(1), 143-169.
270. Brolazo, E. M., Simões, J. A., Nader, M. E. F., Tomás, M. S. J., Gregoracci, G. B., & Marconi, C. (2009). Prevalence and characterization of vaginal lactobacillus species in women at reproductive age without vulvovaginitis. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, *31*(4), 189-195.
271. Zhou, X., Hansmann, M. A., Davis, C. C., Suzuki, H., Brown, C. J., Schütte, U., ... & Forney, L. J. (2010). The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *58*(2), 169-181.
272. Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U. M., Zhong, X., ... & Abdo, Z. (2012). Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Science translational medicine*, *4*(132), 132ra52-132ra52.
273. Hyman, R. W., Herndon, C. N., Jiang, H., Palm, C., Fukushima, M., Bernstein, D., ... & Giudice, L. C. (2012). The dynamics of the vaginal microbiome during infertility therapy with in vitro fertilization-embryo transfer. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *29*(2), 105-115.
274. Ma, L., Lv, Z., Su, J., Wang, J., Yan, D., Wei, J., & Pei, S. (2013). Consistent condom use increases the colonization of *Lactobacillus crispatus* in the vagina. *PLoS One*, *8*(7), e70716.
275. Song, Y. L., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C. X., Kato, H., & Watanabe, K. (1999). Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli

- isolated from Japanese women and newborn infants. *Journal of clinical microbiology*, 37(9), 3062-3064.
276. Dimitonova, S. P., Bakalov, B. V., Aleksandrova-Georgieva, R. N., & Danova, S. T. (2008). Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. *J Microbiol Immunol Infect*, 41(6), 469-477.
277. Stapleton, A. E., Au-Yeung, M., Hooton, T. M., Fredricks, D. N., Roberts, P. L., Czaja, C. A. & Stamm, W. E. (2011). Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clinical infectious diseases*, 52(10), 1212-1217.
278. Chernes, T. L., Hillier, S. L., Meyn, L. A., Busch, J. L., & Krohn, M. A. (2008). A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sexually transmitted diseases*, 35(1), 78-83.
279. Marrazzo, J. M., Antonio, M., Agnew, K., & Hillier, S. L. (2009). Distribution of genital *Lactobacillus* strains shared by female sex partners. *The Journal of infectious diseases*, 199(5), 680-683.
280. Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 53(Supl 2), S166-171.
281. Uthayakumar, S. (1998). Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia-cause or coincidence?. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 18(6), 572-574.
282. Gao, W., Weng, J., Gao, Y., & Chen, X. (2013). Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases*, 13(1), 271.
283. Gillet, E., Meys, J. F., Verstraelen, H., Bosire, C., De Sutter, P., Temmerman, M., & Broeck, D. V. (2011). Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC infectious diseases*, 11(1), 10.
284. Guo, Y. L., You, K., Qiao, J., Zhao, Y. M., & Geng, L. (2012). Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *International journal of STD & AIDS*, 23(8), 581-584.

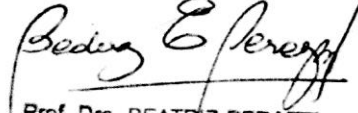
285. Rodríguez Salvá, A., Echavarría Aguilera, Á. A., Murlá Alonso, P., & Vázquez González, C. (1999). Factores de riesgo del cáncer de cérvix en el municipio Cerro. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 37(1), 40-46.
286. Franco Argote, O., Valladares Vallín, J., & Pérez Ramos, G. (2011). Neoplasia intraepitelial cervical en un área de salud. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 37(2), 193-203.
287. Arenas Aponte, R., Henríquez Romero, D., & González Blanco, M. (2011). Cáncer de cuello uterino en mujeres menores de 35 años y mayores de 60 años. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 71(4), 252-264.
288. Serman, F. (2002). Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano: perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 67(4), 318-323.
289. Haverkos, H., Rohrer, M., & Pickworth, W. (2000). The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 54(1), 54-59.
290. Campaner, A. B., Eras, A. E., Paganini, C. B. L., & Galvão, M. A. L. (2011). The effect of cigarette smoking on cell proliferation in normal uterine cervix epithelium. *Archives of gynecology and obstetrics*, 284(1), 119-123.
291. Fonseca-Moutinho, J. A. (2011). Smoking and cervical cancer. *ISRN obstetrics and gynecology*, 2011.
292. Prokopczyk, B., Cox, J. E., Hoffmann, D., & Steven E, S. E. (1997). Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(12), 868-873.
293. Alam, S., Conway, M. J., Chen, H. S., & Meyers, C. (2008). The cigarette smoke carcinogen benzo [a] pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *Journal of virology*, 82(2), 1053-1058.
294. Zeidel, A., Beilin, B., Yardeni, I., Mayburd, E., Smirnov, G., & Bessler, H. (2002). Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 46(8), 959-964.
295. Magnusson, P. K., & Gyllensten, U. B. (2000). Cervical cancer risk: is there a genetic component?. *Molecular medicine today*, 6(4), 145-148.
296. Ramos, J. M., Bedoya, A. M., García, V. F., & Vásquez, G. I. S. (2010). Variantes del Papilomavirus Humano 16 y su asociación con el HLA en cáncer cervical. *Revista Salud UIS*, 42(3).



SONIA E. FOSCH
BIOQUIMICA
MAT. 61 - L.1 - F.30

Bioquímica Sonia Elena María FOSCH

TESISTA



Prof. Dra. BEATRIZ PERAZZI
AREA BACTERIOLOGIA CLINICA/
DEPTO. BIOQUIMICA CLINICA
FAB. FARMACIA Y BIOQUIMICA U.B.A.

Profesora Dra. Beatriz E. PERAZZI

DIRECTORA

FIRMA



HOSPITAL DE CLINICAS
Dr. Luis Aspetto Palaoro
Mendoza
Farmacología

Profesor Dr. Luis PALAORO

CODIRECTOR



Profesor Dr. Ramón A. De Torres

DIRECTOR ADJUNTO