



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EFFECTOS DE LA DIABETES MELLITUS GESTACIONAL EN
LA ESTRUCTURA DE LA MICROBIOTA CERVICOVAGINAL**

Por:

IBT. Lisset Hernández Cosío

TESIS APROBADA POR LA

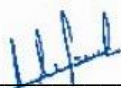
UNIDAD MAZATLÁN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

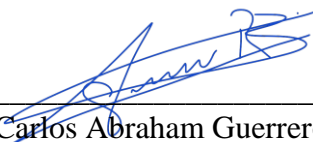
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Lisset Hernández Cosío, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en ciencias.



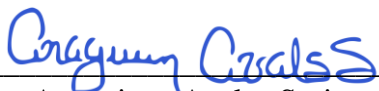
Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Directora de Tesis



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Integrante de comité de tesis



Dr. Carlos Abraham Guerrero Ruíz
Integrante de comité de tesis



Dr. Anaguiven Avalos Soriano
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Efectos de la Diabetes Mellitus Gestacional en la Estructura de la Microbiota Cervicovaginal” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Lisset Hernández Cosío, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado durante mi maestría en el centro de investigación en alimentación y desarrollo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, (CIAD) Unidad Mazatlán por permitirme realizar mis estudios de posgrado y a su vez brindarme sus instalaciones.

Al proyecto “Primera Aproximación al Estudio de la Metilación Global del ADN y la Composición del Microbioma en Mujeres con Diabetes Mellitus Gestacional” de UC MEXUS – CONACYT por permitirme participar y aportar información.

A las pacientes de este proyecto, las cuales proporcionaron manera voluntaria su muestra.

A los médicos especialistas Dr. Victor Arrenquin Romero, Dr. Efrén Peraza Manjarrez y el Dr. Virgilio Angeles Zatarain por el apoyo durante el reclutamiento de pacientes y toma de muestras.

A mi directora de tesis, la Dra. Silvia Alejandra García Gasca por permitirme ser su alumna de posgrado, a su vez por todas las enseñanzas que me proporcionó para lograr esta meta, su confianza y paciencia. ¡Muchas gracias!.

A los hospitales privados: Hospital Sharp Mazatlán y Clínica San Martín por permitir realizar la toma de muestra.

A M. en C. Estela Rodríguez Ibarra por todo el apoyo brindado durante la maestría.

A M. en C. Rubí Hernández Cornejo, por brindarme su ayuda en el laboratorio de biología molecular y a su vez por las asesorías en las técnicas de extracción y PCR.

A M. en C. Julissa Enciso Ibarra por brindarme su ayuda con las técnicas de secuenciación.

A los miembros de mi comité de tesis, Dr. Bruno Gómez Gil, Dr. Abraham Guerrero y el Dr. Anaguiven Ávalos por su tiempo, brindarme sus conocimientos en bioinformática, sus consejos y comentarios durante la elaboración de mi tesis.

A mi familia por apoyarme especialmente mi papá y mi abuela que siempre mostraron interés en mi educación.

A mis compañeros de posgrado con los que compartí tiempo y formé una buena amistad, Ángel Daniel Paéz, María José Soto y Dennise Lizarraga.

A mis amigos que siempre mostraron su apoyo incondicional y me brindaron ayuda emocional cuando la necesitaba, gracias por todo Machado, Luis Eduardo, Alejandra, Cynthia y Areli.

DEDICATORIA

Para mi papá que siempre tuvo confianza en mí, espero que te sientas orgulloso.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| APROBACIÓN | 2 |
| DECLARACIÓN INSTITUCIONAL | 3 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| DEDICATORIA | 5 |
| CONTENIDO | 6 |
| LISTA DE FIGURAS | 8 |
| LISTA DE CUADROS | 11 |
| RESUMEN | 13 |
| ABSTRACT | 14 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 15 |
| 2. ANTECEDENTES | 18 |
| 2.1. Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Gestacional..... | 18 |
| 2.2 Criterios de Diagnóstico de la Diabetes Mellitus Gestacional..... | 20 |
| 2.3. Microbiota Vaginal..... | 22 |
| 2.4 Micobiota Vaginal..... | 25 |
| 2.5 Microbiota Vaginal en el Embarazo..... | 26 |
| 2.6. Disbiosis Vaginal..... | 28 |
| 2.7. <i>Lactobacillus Iners</i> | 31 |
| 2.8 Microbioma Vaginal y su Relación con la Diabetes Mellitus Gestacional..... | 32 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 34 |
| 4. HIPÓTESIS | 35 |
| 5. OBJETIVOS | 36 |
| 5.1. Objetivo General..... | 36 |
| 5.2. Objetivos Específicos..... | 36 |
| 6. METODOLOGÍA | 37 |
| 6.1. Participantes del Estudio y Muestreo..... | 37 |
| 6.2 Aislamiento de ADN Bacteriano..... | 38 |
| 6.3 Concentración e Integridad de ADN..... | 39 |
| 6.4 Amplificación del Gen ARNr 16S por Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)..... | 39 |
| 6.5 Preparación de Bibliotecas y Secuenciación..... | 40 |
| 6.5.1 Tagmentación e Indexación | 40 |
| 6.5.2. Purificación de Amplicones con Perlas Magnéticas Ampure | 41 |
| 6.5.3 Preparación del Pool | 42 |
| 6.5.4 Dilución y Desnaturalización del Control PhiX 10 nM..... | 42 |
| 6.6 Análisis Bioinformático y Estadístico de la Amplificación del Gen ARNr 16s | 43 |
| 6.7 Análisis Bioinformático y Estadístico de la Secuenciación Metagenómica (Shotgun) | 45 |

CONTENIDO (continuación)

| | |
|--|------------|
| 6.8 Clasificación Funcional | 47 |
| 7. RESULTADOS | 49 |
| 7.1 Secuenciación V3 del Gen ARNr 16S | 50 |
| 7.1.1 Análisis de la Representatividad de Secuenciación | 51 |
| 7.1.2 Composición Taxonómica de la Microbiota: Phyla | 52 |
| 7.1.3 Composición Taxonómica de la Microbiota: Familia | 53 |
| 7.1.4 Composición Taxonómica de la Microbiota: Género | 55 |
| 7.1.5 Análisis de Alfa Diversidad | 58 |
| 7.1.6 Análisis de Beta Diversidad | 60 |
| 7.2. Resultados de la Secuenciación Metagenómica | 62 |
| 7.2.1 Análisis de la Representatividad de Secuenciación | 63 |
| 7.2.2 Abundancia Relativa: Especie | 64 |
| 7.2.3 Tipos de Estado Comunitario (CSTs) | 66 |
| 7.2.4 Diversidad Alfa | 68 |
| 7.2.5 Diversidad Beta | 70 |
| 7.2.6 Comparacion de los Métodos de Secuenciacion | 71 |
| 7.3 Metagenómica Funcional | 73 |
| 8. DISCUSIONES | 76 |
| 9. CONCLUSIONES | 82 |
| 10. RECOMENDACIONES | 83 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA | 84 |
| 12. ANEXOS | 100 |
| 12.1 Cuestionario Aplicado a las Pacientes de Estudio y Aprobación del Comité de Ética | 100 |
| 12.2. Protocolo de Extracción de ADN | 103 |
| 12.3. Diferencias en la Estructura Cervicovaginal de Pacientes que Presentaron COVID-19 Durante el Embarazo (Prueba de Anticuerpos Positiva) | 104 |
| 12.4. Diferencias en la Estructura Cervicovaginal de Acuerdo a su Índice de Masa Corporal | 107 |
| 12.5. Ejes 1:3 y 2:3 del Análisis UniFrac Ponderado y no Ponderado de las Secuencias ARNr 16S | 112 |
| 12.6. Ejes 1:3 y 2:3 del Diagrama de Cordenadas Bray Curtis de los Resultados Metagenómicos | 114 |
| 12.7. Taxas Identificados en la Microbiota Vaginal de Pacientes con DMG (Secuenciación ARNr 16S) | 115 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|--------|
| 1. Fisiopatología de la diabetes gestacional en la madre y el feto. IGF: factor de crecimiento tipo insulina; IGFBP: proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina; GLUT: transportador de glucosa (Tomado de Bougherara <i>et al.</i> , 2018)..... | 19 |
| 2. Representación de tipos de estados comunitarios vaginales sanos dentro de cada grupo étnico de mujeres en edad reproductiva (Tomado de Ravel <i>et al.</i> , 2011)..... | 24 |
| 3. Factores intrínsecos y extrínsecos que afectan a la comunidad microbiana vaginal. Las niñas prepúberes y las mujeres posmenopáusicas tienen una abundancia relativamente baja de especies de <i>Lactobacillus</i> (Tomado de Kwon y Lee, 2022)..... | 25 |
| 4. Micobiota y microbiota en diferentes sitios anatómicos (tomado de Krüger <i>et al.</i> , 2019). | 26 |
| 5. Procedimiento a seguir para la toma de frotis de la mucosa cervicovaginal (Tomado de Winslow, 2009). | 38 |
| 6. Integridad del ADN extraído de muestras cervicovaginales por medio del kit QIAmp (QIAGEN). MPM indica el marcador de peso molecular. Los números identifican a las pacientes que participaron en este estudio | 39 |
| 7. Diagrama de flujo de análisis bioinformático y estadístico de la secuenciación del gen ARNr 16S región V3..... | 45 |
| 8. Diagrama de flujo de análisis bioinformático y estadístico de la secuenciación metagenómica para la clasificación taxonómica. | 47 |
| 9. Diagrama de flujo de análisis bioinformático y estadístico de la secuenciación metagenómica para la clasificación funcional. | 48 |
| 10. Curva de rarefacción de la riqueza de especies en cada muestra. Se puede observar que después de las doce mil secuencias se alcanzó la asíntota. | 51 |
| 11. Composición taxonómica, los colores representan los 10 phyla con mayor abundancia relativa (%). Los números a lo largo del eje x indican las muestras individuales. | 52 |
| 12. Composición taxonómica, los colores representan las 15 familias con mayor abundancia relativa (%). Los números a lo largo del eje x indican las muestras individuales. | 54 |
| 13. Composición taxonómica, los colores representan los 15 géneros con mayor abundancia relativa (%). Los números a lo largo del eje x indican las muestras individuales. | 56 |
| 14. Gráfica de abundancia relativa que muestra las diferencias entre el grupo control y el grupo DMG con respecto a la categoría taxonómica de Género. | 57 |

LISTA DE FIGURAS (continuación)

| Figura | Página |
|---|---------------|
| 15. Boxplot de los valores de los índices de riqueza Chao 1. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad y muestran la mediana de cada grupo, la línea superior indica los resultados de la ANOVA de una sola vía. | 59 |
| 16. Boxtplot de los valores de los índices de riqueza de Shannon-Wiener. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad y muestran la mediana de cada grupo, la línea superior indica los resultados de la ANOVA de una sola vía. | 60 |
| 17. Diagrama PCoA-UniFrac ponderado, que muestra la separación de las muestras control (naranja) y DMG (verde). La figura muestra los ejes PCoA 1 (52.3%) y PCoA 2 (29.8%), mientras que los ejes 1:3 y 2:3 se encuentran en el Anexo 4. | 61 |
| 18. Diagrama PCoA-UniFrac no ponderado, que muestra la separación de las muestras Control (rojo) y DMG (azul). La figura muestra los ejes PCoA 1 (56.4%) y PCoA 2 (16.7%), mientras que los ejes 1:3 y 2:3 se encuentran en el Anexo 4. | 62 |
| 19. Curva de rarefacción de la riqueza de especies, cada curva representa un metagenoma individual. A medida que aumenta el número de secuencias de una muestra, aumenta el número de OTUs. | 64 |
| 20. Composición taxonómica, los colores representan las 20 especies con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x. | 65 |
| 21. Mapa de calor de la composición de la microbiota cervicovaginal de las 20 especies más abundantes y agrupación de tipo de estado comunitario (CST). | 67 |
| 22. Boxtplot de los valores de los índices de riqueza de Chao1. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad alfa y muestran la mediana de cada grupo. La línea superior indica los resultados de la ANOVA de una sola vía. | 68 |
| 23. Boxtplot de los valores de los índices de Shannon. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad alfa y muestran la mediana de cada grupo. La línea superior indica los resultados de la ANOVA de una sola vía. | 69 |
| 24. Diagrama de coordenadas principales Bray Curtis que muestra la separación de las muestras control (rojo) y DMG (azul).). La figura muestra los ejes PCoA 1 (30.7%) y PCoA 2 (17.9%), mientras que los ejes 1:3 y 2:3 se encuentran en el Anexo 5. | 70 |
| 25. Boxtplot de los valores de los índices de riqueza de Chao1. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad alfa y muestran la mediana de cada grupo..... | 71 |
| 26. Boxtplot de los valores de los índices de Shannon. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad alfa y muestran la mediana de cada grupo. | 72 |

LISTA DE FIGURAS (continuación)

| Figura | Página |
|---|---------------|
| 27. Mapa de calor de la abundancia relativa de las vías funcionales | 74 |
| 28. Composición taxonómica, los colores representan los 15 géneros con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x..... | 104 |
| 29. Composición taxonómica, los colores representan las 20 especies con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x..... | 105 |
| 30. Composición taxonómica, los colores representan los 15 géneros con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x. | 107 |
| 31. Composición taxonómica, los colores representan las 20 especies con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x..... | 109 |
| 32. Diagrama PCoA-UniFrac ponderado, que muestra la separación de las muestras control (naranja) y DMG (verde). La figura A) muestra los ejes PCoa 1 y Pcoa 3. La figura B) muestra los ejes PCoA 2 y PCoA 3..... | 112 |
| 33. Diagrama PCoA-UniFrac no ponderado, que muestra la separación de las muestras control (rojo) y DMG (azul). La figura A) muestra los ejes PCoa 1 y Pcoa 3. La figura B) muestra los ejes PCoA 2 y PCoA 3. | 113 |
| 34. Diagrama PCoA Bray-Curtis, que muestra la separación de las muestras control (rojo) y DMG (azul). La figura A) muestra los ejes PCoA 1 y Pcoa 3. La figura B) muestra los ejes PCoA 2 y PCoA 3. | 114 |

LISTA DE CUADROS

| Cuadro | Página |
|--|--------|
| 1. Criterios de diagnóstico para la diabetes mellitus gestacional de acuerdo a la OMS (2013), IADPSG (2010) y ADA (2020). Curva de tolerancia a la glucosa (CTGO*). | 20 |
| 2. Criterios de diagnóstico para la diabetes manifiesta de acuerdo a la OMS (2013), IADPSG (2010) y ADA (2020). CTGO*, Curva de tolerancia a la glucosa. | 21 |
| 3. Criterios de Amsel para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana, tres de los cuatro criterios anteriores deben estar presentes para confirmar el diagnóstico (Amsel <i>et al.</i> , 1983). | 29 |
| 4. Puntuación de Nugent para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana, 0: No morfotipos presentes, 1+: < de un morfotipo presente, 2+: 1 a 4 morfotipos presentes, 3+: 5 a 30 morfotipos presentes, 4+: 30 o más morfotipos presentes (Nugent <i>et al.</i> , 1991; Parra, 2015). | 30 |
| 5. Criterios médicos para el diagnóstico de la DMG de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2013). * Hemoglobina glucosilada..... | 37 |
| 6. Reactivos utilizados en la PCR punto final. | 40 |
| 7. Secuencias de los Primers V3 (indicados en rojo) con sus adaptadores Illumina (Huse <i>et al.</i> , 2008). | 40 |
| 8. Índices de diversidad alfa. | 44 |
| 9. Características clínicas de las pacientes. Se realizó un test exacto de Fisher para la validación estadística de las variables categóricas mientras que se realizó una prueba t de student (t-test) para validación de las variables numéricas. *curva de tolerancia oral a la glucosa. ** Índice de masa corporal..... | 49 |
| 10. Índices de masa corporal y lecturas totales después de los procesos de limpieza y eliminación de chimeras para cada muestra. | 50 |
| 11. Abundancia relativa de los fillos más abundantes. | 53 |
| 12. Abundancia relativa de las 15 familias más abundantes. | 55 |
| 13. Prueba t de student para los 15 géneros con mayor abundancia de lecturas, para la normalización de los datos se realizó un test de Shapiro. | 57 |
| 14. Resultados del ANOVA de una sola vía (media \pm desviación estándar). Se realizó una prueba Post-hoc de Tuckey..... | 59 |
| 15. Resultados del ANOVA de una sola vía (media \pm Desviación estándar). Se realizó una prueba Post-hoc de Tuckey..... | 60 |
| 16. Cantidad de secuencias metagenómicas por muestra. | 62 |
| 17. Especies del género <i>Lactobacillus</i> que se encontraron en ambos grupos. | 65 |

LISTA DE CUADROS (continuación)

| Cuadro | Página |
|--|---------------|
| 18. Prueba t de student para las 20 especies más abundantes, para la normalización de los datos se realizó un test de Shapiro. | 66 |
| 19. Resultados del ANOVA de una sola via (media \pm desviacion estándar). Se realizó una prueba Post-hoc de Tuckey. | 68 |
| 20. Resultados del ANOVA de una sola via (media \pm desviacion estándar). Se realizó una prueba Post-hoc de Tuckey. | 69 |
| 21. Resultados del ANOVA de una sola via (media \pm desviacion estándar). Se realizó una prueba Post-hoc de Tuckey. | 72 |
| 22. Identificación de vías funcionales | 73 |
| 23. Abundancia relativa de los 15 géneros más abundantes | 105 |
| 24. Abundancia relativa de las 20 especies más abundantes. | 106 |
| 25. Abundancia relativa de los géneros más abundantes (IMC). | 108 |
| 26. Abundancia relativa de las 20 especies más abundantes (IMC). | 110 |
| 27. Prueba t de student para las especies más abundantes dentro del grupo con obesidad y sobrepeso, para la normalización de los datos se realizó un test de Shapiro. | 111 |

RESUMEN

La vagina humana está colonizada por una variedad de microorganismos que en conjunto reciben el nombre de microbiota vaginal. Durante el embarazo, la microbiota vaginal presenta cambios significativos incluyendo una disminución en la diversidad microbiana y un enriquecimiento de especies de *Lactobacillus*, las cuales actúan en el epitelio vaginal mediante la producción de varios compuestos como el ácido láctico, biosurfactantes, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, generando un ambiente ácido con un pH por debajo de 4.5, estableciendo una defensa contra los microorganismos patógenos/opportunistas. La diabetes mellitus gestacional (DMG) se define como una hiperglucemia diagnosticada por primera vez en el embarazo y se asocia con un control metabólico deficiente, índice de masa corporal elevado y función leucocitaria alterada, por lo que algunos autores indican que la DMG pudiera alterar la microbiota vaginal (disbiosis vaginal). El objetivo del presente estudio fue determinar si existen cambios estructurales y funcionales en la microbiota vaginal que se asocien a condiciones de disbiosis en las mujeres que padecen DMG, para esto se realizó la secuenciación de la región V3 del gen ARNr 16S y la secuenciación metagenómica (shotgun) mediante la plataforma Illumina Miniseq. La investigación mostró que *Lactobacillus* es el género dominante tanto en pacientes con DMG como en mujeres embarazadas sanas. Este estudio también determinó que la especie más abundante es *L. crispatus*, sin embargo, la abundancia de taxones asociados a la disbiosis vaginal fue mayor en las pacientes con DMG en comparación con las mujeres embarazadas sanas, además de identificar una mayor diversidad de géneros y especies en las pacientes que presentaron DMG, aunque no se observaron diferencias significativas.

Palabras clave: *Lactobacillus*, microbiota vaginal, diabetes mellitus gestacional, disbiosis vaginal, metagenómica Shotgun.

ABSTRACT

The human vagina is colonized by a variety of microorganisms that together are known as the vaginal microbiome. During pregnancy, the vaginal microbiome undergoes significant changes including a decrease in microbial diversity and an enrichment of *Lactobacillus* species, which act on the vaginal epithelium by producing various compounds such as lactic acid, biosurfactants, hydrogen peroxide and bacteriocins, generating an acidic environment with a pH below 4.5, establishing a defense against pathogenic/opportunistic microorganisms. Gestational diabetes mellitus (GDM) is defined as hyperglycemia first diagnosed in pregnancy and is associated with poor metabolic control, elevated body mass index and altered leukocyte function, so some authors suggest that GDM may alter the vaginal microbiota (vaginal dysbiosis). The aim of the present study was to determine whether there are structural and functional changes in the vaginal microbiome that are associated with dysbiosis conditions in women with GDM, for which the sequencing of the V3 region of the 16S rRNA gene and metagenomic sequencing (shotgun) were performed using the Illumina Miniseq platform. The research showed that *Lactobacillus* is the dominant genus in both GDM patients and healthy pregnant women. This study also determined that the most abundant species is *L. crispatus*, however, the abundance of taxa associated with vaginal dysbiosis was higher in patients with GDM compared to healthy pregnant women in addition to identifying a greater diversity of genera and species in patients with GDM although no significant differences were observed.

Key words: *Lactobacillus*, vaginal microbiota, gestational diabetes mellitus, vaginal dysbiosis, shotgun metagenomics.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que padecen más de 283 millones de personas, un número que se estima que alcance a los 592 millones en 2035 (Laredo-Aguilera *et al.*, 2020). Es un trastorno metabólico grave que constantemente requiere atención médica y autocontrol para limitar las complicaciones, como la obesidad, el daño renal y las enfermedades cardiovasculares (Sharma *et al.*, 2022). Los principales subtipos de DM son la diabetes tipo 1 mellitus (DMT1), diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y diabetes mellitus gestacional (DMG), que clásicamente resultan de una secreción (DM1) y/o acción (DM2) defectuosa de la insulina. La DMT1 se presenta en niños o adolescentes, mientras que se cree que la DMT2 afecta a adultos de mediana edad y mayores que tienen hiperglucemia prolongada debido a un estilo de vida y dietas deficientes (Sapra y Bhandari, 2023).

El subtipo diabetes mellitus gestacional ocurre durante el embarazo y afecta gravemente tanto a la madre como al feto en crecimiento. En los últimos 20 años, la prevalencia de la DMG se encuentra en alza debido principalmente a los cambios en los hábitos alimentarios de las pacientes, el sedentarismo, el aumento de la edad materna, así como la elevación del índice de masa corporal (IMC) (Bougherara *et al.*, 2018). Esta enfermedad es caracterizada por un estado de hiperglucemia resultante de la disfunción crónica de las células β pancreáticas y la resistencia materna a la acción de la insulina (American Diabetes Association, 2022).

La DMG es la condición médica más común que afecta a mujeres embarazadas y sus hijos. La DMG comprende aproximadamente el 85% de los casos que se padecen en el embarazo. Esta condición, se define como la hiperglucemia diagnosticada por primera vez durante el segundo o tercer trimestre de embarazo que, no es claramente una diabetes preexistente de tipo 1 (DMT1) o de tipo 2 (DMT2) (American Diabetes Association, 2020; Stewart, 2020). Se estima que la DMG afecta del 7 al 14% de las gestaciones en todo el mundo (Behboudi-Gandevani, *et al.*, 2019). En México, la proporción de mujeres afectadas puede alcanzar entre 17.7% a 30.1%, aunque no existe un enfoque uniforme para su diagnóstico (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2016; Reyes-Muñoz *et al.*, 2012).

Un embarazo saludable, se caracteriza por un aumento progresivo de la resistencia a la insulina desde el segundo trimestre hasta el momento del parto. Esto se atribuye a una variedad de factores,

como el aumento de la secreción de lactógeno placentario humano (HPL), hormona del crecimiento placentario (PHG), prolactina (PRL) y progesterona (P4). Una combinación de aumento de la adiposidad materna y resistencia a la insulina contribuye a un estado de hiperglucemia en mujeres con una función inadecuada de las células β pancreáticas (Gao *et al.*, 2021; Lefkovits *et al.*, 2019). La hiperglucemia y la resistencia a la insulina se desarrollan durante el periodo gestacional y disminuyen después del parto cuando los niveles de hormonas derivadas de la placenta también disminuyen (Kampmann *et al.*, 2019). Sin embargo, las mujeres embarazadas con hiperglucemia presentan un mayor riesgo de padecer DMG en embarazos posteriores, además, poseen una mayor predisposición de padecer DMT2 (Bellamy *et al.*, 2009; Farrar 2016; Federación Internacional de Diabetes, 2019).

El riesgo de padecer DMT2 está asociado con la resistencia a la insulina y a la disfunción progresiva de las células β del páncreas tras padecer DMG (McIntyre *et al.*, 2019). Algunos factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad incluyen la edad materna avanzada, antecedentes familiares de diabetes, DMG en embarazos anteriores, etnia, obesidad y el tabaquismo (Kunasegaran *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2016; Zhang y Ning, 2011). Autores como Cortez *et al.*, 2019 y Taddei *et al.*, 2018 han demostrado que el microbioma intestinal, oral y vaginal influyen en el desarrollo gestacional y la DMG. Se ha demostrado un aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias en la DMG, así como un aumento en la abundancia de bacterias patógenas potenciales, caracterizando un perfil disbiótico del microbioma vaginal.

El tracto reproductivo inferior femenino está compuesto por un epitelio escamoso estratificado y células glandulares que producen secreciones cervicovaginales, en las cuales se encuentra una diversidad de microorganismos, en especial una compleja comunidad de bacterias que actúan conjuntamente para proteger al huésped de las enfermedades, esto se conoce como microbiota vaginal o cérvicovaginal (Chen *et al.*, 2021; Kalia *et al.*, 2020), y constituye el 9% de la microbiota humana total (Sirota *et al.* 2014). La composición de la microbiota vaginal influye significativamente en su salud sexual y reproductiva, incluido el riesgo de resultados adversos en el parto, como el aborto espontáneo, parto prematuro y la adquisición de infecciones como la corioamnionitis (Moosa *et al.*, 2020).

El microbioma vaginal humano está dominado por bacterias del género *Lactobacillus*, las cuales procesan el glucógeno para producir ácido láctico, lo que lleva a un pH vaginal menor a 4.5 (Miller *et al.*, 2016). En la mayoría de las mujeres sanas predominan *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*,

L. iners, *L. jensenii* y especies de bacterias anaerobias (Moumne *et al.*, 2021). Los géneros bacterianos que incluyen *Prevotella*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera* y *Mobiluncus* se han asociado con microbiota vaginal no saludable en mujeres asintomáticas en edad reproductiva (Saraf *et al.*, 2021).

La disbiosis vaginal, se define como un microbioma en el que no predominan bacterias del género *Lactobacillus*, múltiples factores como la edad, origen étnico, uso de anticonceptivos, duchas vaginales, actividad sexual, exposición a antibióticos, tabaquismo, entre otros pueden provocar esta condición (Kervinen *et al.*, 2019). La afección clínica más común y mejor estudiada que provoca una disbiosis vaginal es la vaginosis bacteriana (VB), la cual, afecta entre 23-29% de mujeres en el mundo (Peebles *et al.*, 2019; Van de Wijgert y Jaspers, 2017). En México la prevalencia de VB puede alcanzar hasta 32.9%, estando subdiagnosticada debido a que algunos casos no presentan síntomas (González-Pedraza *et al.*, 2004).

Con el fin de estudiar la microbiota vaginal, se han desarrollado múltiples enfoques que involucran tecnologías “ómicas” que permiten analizar la composición microbiana, y proporciona información sobre el potencial genético de la comunidad bacteriana (Martin y Marrazzo, 2016).

Bajo este contexto, el presente estudio tiene como objetivo determinar por medio de la amplificación y secuenciación de la región variable V3 del gen 16S ARNr y secuenciación metagenómica si existen cambios en la microbiota vaginal que se asocien a condiciones de disbiosis en las mujeres que presentan DMG y realizar un análisis de metagenómica funcional para el estudio de las interacciones huésped-microbioma.

2. ANTECEDENTES

2.1. Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Gestacional

El embarazo es un estado de resistencia a la insulina y de hiperinsulinismo. La insulinoresistencia es fisiológica y reversible; se presenta al comienzo del segundo trimestre y se acentúa progresivamente durante el tercer trimestre, esto es el resultado de la combinación de un aumento de la masa adiposa materna y un efecto “antiinsulínico” de las hormonas que produce la placenta (Bougherara *et al.*, 2018; Harlev y Wiznitzer, 2010). Este fenómeno es promovido por la producción de hormonas locales y placentarias como el estrógeno, la progesterona, la leptina, el cortisol, el lactógeno placentario y la hormona del crecimiento placentario (Stern *et al.*, 2021). La glucosa en la sangre aumenta a medida que disminuye la sensibilidad a la insulina, particularmente después de la ingestión de alimento, y se producen cambios en los niveles de ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol y fosfolípidos. Estos cambios son parte de una adaptación para satisfacer la demanda energética del feto y preparar al organismo materno para el parto y la lactancia (Di Cianni *et al.*, 2003; Parretti *et al.*, 2020). Para equilibrar este proceso y evitar la hiperglucemia excesiva y la intolerancia a la glucosa en la madre durante el embarazo, las células β pancreáticas experimentan cambios notables en su función, incluidos el aumento de su proliferación y la secreción de insulina estimulada por glucosa (Salazar-Petres y Sferruzzi-Perri, 2022).

Cuando las células *beta* pancreáticas pierden la capacidad de detectar adecuadamente la glucosa circulante en la sangre o secretar suficiente insulina en respuesta, se tiene como resultado la disfunción de las células *beta*, provocando un ambiente hiperglucémico (figura 1) (Plows *et al.*, 2018). El aumento de la resistencia a la insulina también se relaciona con el exceso de lipólisis, la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo y la secreción de factores inflamatorios y adipocinas (Abell *et al.*, 2015). La captación de glucosa en la señalización de insulina se produce a través de la autofosforilación del receptor de insulina, que activa y recluta moléculas GLUT para abrir canales celulares para permitir que la glucosa entre en la célula. Los efectores como el Sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) se activan cuando la entrada de GLUT abre canales de membrana para la captación de glucosa. Las mujeres

embarazadas afectadas por DMG en la última etapa de la gestación exhiben expresión de IRS1 regresiva, lo que minimiza la fosforilación de tirosina en una subunidad β del receptor de insulina, lo que finalmente da como resultado una mayor tolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina (Sharma *et al.*, 2022; Gao *et al.*, 2020).

El aumento antes mencionado en el transporte placentario de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos estimula la producción endógena de insulina y factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) en el feto, lo cual puede causar un crecimiento excesivo del feto, lo que a menudo resulta en macrosomía al nacer (Plows *et al.*, 2018).

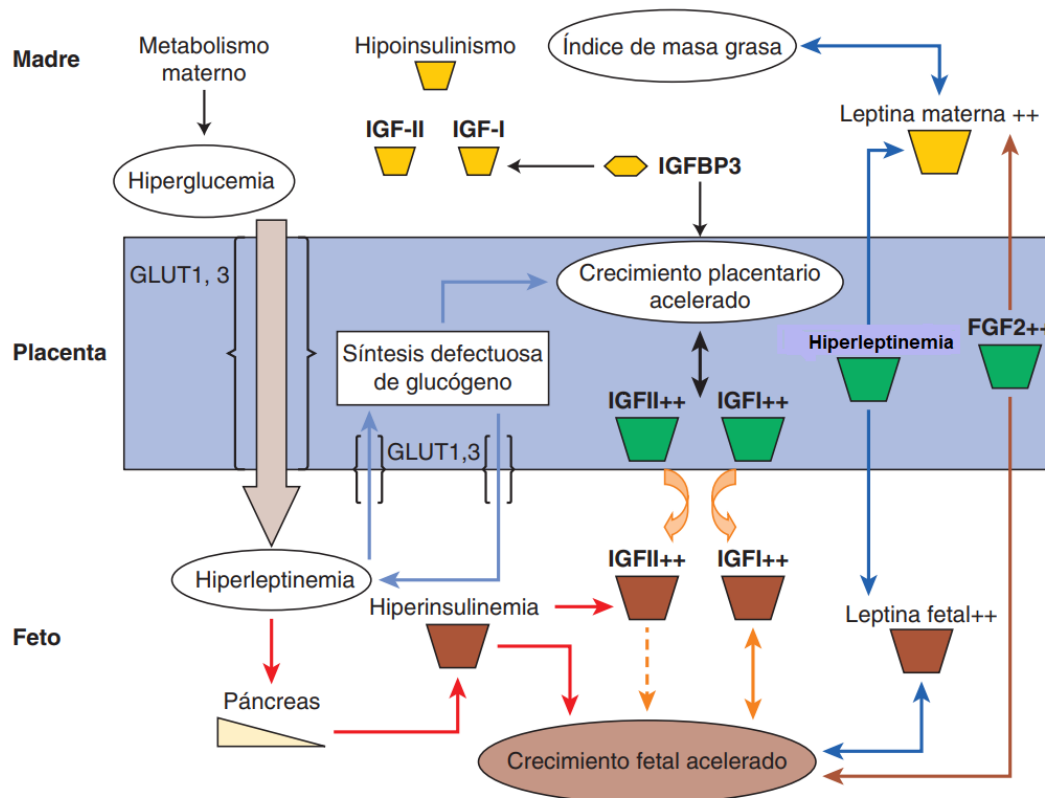


Figura 1. Fisiopatología de la diabetes gestacional en la madre y el feto. IGF: factor de crecimiento tipo insulina; IGFBP: proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina; GLUT: transportador de glucosa (Tomado de Bougherara *et al.*, 2018).

Generalmente el tratamiento para la diabetes mellitus gestacional se caracteriza por dieta, ejercicio, metformina o insulina (en caso necesario) y, después del embarazo, las células β , la glucosa en

sangre y la sensibilidad a la insulina pueden volver a la normalidad, aunque existe evidencia de que la DMG es un precursor de la DMT2 en mujeres con predisposición que sufren problemas metabólicos del embarazo (Choudhury *et al.*, 2021; Herath *et al.*, 2017).

Las complicaciones de la DMG afectan tanto a la madre como al recién nacido. La madre presenta un mayor riesgo de desarrollar preeclampsia y parto prematuro durante el embarazo, así como de desarrollar DMT2, mientras que las complicaciones para la descendencia es macrosomía al nacer, problemas cardíacos, anomalías renales y un alto riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas o crónico-degenerativas en la vida adulta (Lizárraga y García-Gasca, 2021).

2.2 Criterios de Diagnóstico de la Diabetes Mellitus Gestacional

La DMG es una de las endocrinopatías más comunes durante el embarazo que se define como hiperglucemia durante el embarazo (Behboudi-Gandevani *et al.*, 2019). Las estrategias de cribado, los métodos de ensayo e incluso los umbrales glucémicos óptimos de diagnóstico han sido objeto de debate. Los criterios de diagnóstico originales se desarrollaron en 1964 por O'sullivan y Mahan, desde entonces se ha respaldado el uso de una prueba de tolerancia a la glucosa oral (CTGO) de 75g a finales del segundo trimestre como la estrategia preferida de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Asociación Internacional de Diabetes en los Grupos de Estudio del Embarazo (IADPSG) y la Asociación Americana de Diabetes (ADA) (Sexton *et al.*, 2018; Zera *et al.*, 2021) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Criterios de diagnóstico para la diabetes mellitus gestacional de acuerdo a la OMS (2013), IADPSG (2010) y ADA (2020). Curva de tolerancia a la glucosa (CTGO*).

| OMS | IADPSG | ADA |
|---|---|---|
| - Glucosa en ayuno: ≥ 92 mg/dL | - Glucosa en ayuno: ≥ 92 mg/dL | - Glucosa en ayuno: ≥ 95 mg/dL |
| - CTGO* con carga de 75 gr a la hora: ≥ 180 mg/dL | - CTGO* con carga de 75 gr a la hora: ≥ 180 mg/dL | - CTGO* con carga de 75 gr a la hora: ≥ 180 mg/dL |
| - CTGO con carga de 75 gr a las dos horas: ≥ 153 mg/dL | - CTGO con carga de 75 gr a las dos horas: ≥ 153 mg/dL | - CTGO con carga de 75 gr a las dos horas: ≥ 155 mg/dL |

Aunque la prevalencia de la DMG ha ido en aumento en varias partes del mundo, existen mujeres que tienen mínimo contacto con los servicios de salud (Wang *et al.*, 2022). Esto crea desafíos en la identificación de mujeres con diabetes preexistente no diagnosticada. Las mujeres con diabetes manifiesta tienen hiperglucemia antes de la concepción y durante el primer trimestre, lo que crea un mayor riesgo de efectos negativos (Goyal *et al.*, 2022; Meek, 2017).

Diferentes países utilizan diversos criterios de diagnóstico para detectar la DMG debido a la falta de un criterio estándar. La razón principal es que los criterios fueron diseñados para identificar a las mujeres embarazadas que están en alto riesgo de desarrollar diabetes posterior al embarazo en lugar de aquellas que tienen un mayor riesgo de resultados perinatales adversos (Mishra *et al.*, 2016).

La diabetes pregestacional se refiere a las mujeres que no han sido diagnosticadas con diabetes pero cumplen con los criterios de diabetes. En comparación con la DMG, el riesgo de complicaciones obstétricas puede aumentar linealmente con niveles elevados de glucosa en sangre materna y empeoramiento de los resultados maternos e infantiles (Mañé *et al.*, 2019). La diabetes asociada al embarazo puede aumentar complicaciones durante el embarazo, como la preeclampsia, el parto prematuro, macrosomía y la mortalidad perinatal, son al menos tres veces más frecuentes en mujeres con diabetes pregestacional que en aquellas sin diabetes (Oppermann *et al.*, 2022).

Las recomendaciones de organizaciones como la OMS, IADPSG y ADA reforzaron la importancia de clasificar la diabetes pregestacional en el embarazo por separado de la DMG (Cuadro 2) (Goyal *et al.*, 2022).

Cuadro 2. Criterios de diagnóstico para la diabetes manifiesta de acuerdo a la OMS (2013), IADPSG (2010) y ADA (2020). CTGO*, Curva de tolerancia a la glucosa.

| OMS | IADPSG | ADA |
|--|--|--|
| - Glucosa en ayuno: ≥ 126 mg/dL | - Glucosa en ayuno: ≥ 126 mg/dL | - Glucosa en ayuno: ≥ 126 mg/dL |
| - Glucosa plasmática a las 2 h: ≥ 200 mg/dL | - Glucosa plasmática a las 2 h: ≥ 200 mg/dL | - Glucosa plasmática a las 2 h: ≥ 200 mg/dL |
| -HbA1c: — | -HbA1c: $\geq 6,5$ % | -HbA1c: $\geq 6,5$ % |

2.3. Microbiota Vaginal

La microbiota hace referencia a las comunidades microbianas específicas en un nicho ecológico, mientras que su material genético se denomina como microbioma y difieren entre los sitios del cuerpo y los individuos (Lewis *et al.*, 2017; Domingo y Sánchez, 2018). La microbiota vaginal es un microecosistema intrincado y dinámico que sufre constantes fluctuaciones durante la vida de la mujer. La composición de la microbiota vaginal influye significativamente en la salud sexual y reproductiva, incluido el riesgo de resultados adversos en el embarazo, como abortos espontáneos y partos prematuros (Hočevar *et al.*, 2019), además de aumentar la predisposición de adquirir infecciones de transmisión sexual incluido el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Chen *et al.*, 2021; Moosa *et al.*, 2020).

El epitelio vaginal está lubricado por el líquido cervicovaginal, el cual es un medio ácido que contiene una variedad de moléculas antimicrobianas que incluyen mucinas y β -defensinas, además de anticuerpos IgA e IgG producidos por las células plasmáticas de la mucosa, las cuales forman una barrera física y bioquímica contra organismos patógenos (Amabebe & Anumba, 2018; Torcia, 2019). La vagina alberga un microecosistema que contiene miles de millones de microbios, al realizar una detección sistemática de la biomasa microbiana del tracto reproductivo femenino de 110 mujeres en edad reproductiva mediante la secuenciación del gen ARNr 16S revelaron que la vagina contiene $\sim 10^{10}$ bacterias (Chen *et al.*, 2017). De las comunidades bacterianas que residen en la vagina, las especies del género *Lactobacillus* colonizan predominantemente el tracto vaginal, contribuyendo a la regulación de la inmunidad innata, presentan efectos antitumorales contra el cáncer cervicouterino y efectos virucidas contra el VIH-1, entre otros (Doerflinger *et al.*, 2014; Ñahui *et al.*, 2017; Sungur *et al.*, 2017).

El ginecólogo alemán Albert Döderlein describió por primera vez la presencia de bacilos grampositivos al analizar líquido cervicovaginal de mujeres sanas en edad reproductiva en 1892, recibiendo el nombre de Bacilo de Döderlein (Döderlein, 1892). Años más tarde se identificó este bacilo como *Lactobacillus acidophilus* (Thomas, 1928), considerados como la base de la microbiota vaginal saludable (Aldunate *et al.*, 2015).

Lactobacillus por lo general comprende más del 70 % de las bacterias residentes en la vagina de la mayoría de las mujeres y juegan un papel crucial tanto en la salud vaginal como en el bienestar

ginecológico (Auriemma *et al.*, 2021). Estas bacterias procesan el glucógeno y sus productos de degradación para producir ácido láctico, lo que conduce a un pH vaginal menor a 4.5 (Miller *et al.*, 2016). La proporción de ácido láctico y el pH son características de cada especie de *Lactobacillus* y en menor proporción de las células epiteliales vaginales, es decir, la producción de ácido láctico disminuye a niveles equivalentes al ácido láctico detectado en la vagina. (Tachedjian *et al.*, 2017). Diferentes estudios han sugerido el papel del ácido láctico en la inhibición de una amplia variedad de infecciones, incluida la infección por *Chlamydia trachomatis*, el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2), el VIH y una amplia gama de microorganismos asociados a la VB (Kalia *et al.*, 2020; Tyssen *et al.*, 2018)

Algunos factores como las hormonas y los hábitos de vida pueden cambiar drásticamente la composición del microbioma vaginal. El estrógeno aumenta el volumen de las secreciones vaginales y la elevación de los niveles de estrógeno induce el engrosamiento del epitelio vaginal que a su vez provoca la acumulación de glucógeno, y estimula la proliferación de *Lactobacillus* (Nunn y Forney, 2016; Shen *et al.*, 2022).

Las especies *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* comúnmente dominan la microbiota vaginal de la mayoría de las mujeres en edad reproductiva (Petrova *et al.*, 2017; Moumne *et al.*, 2021). También se ha reportado menor proporción de bacterias anaerobios estrictos del género *Prevotella*, *Megasphaera* y *Atopobium* (Ravel *et al.*, 2011; Mendes-Soares *et al.*, 2014). La mayoría de estudios sobre la microbiota vaginal se han centrado en mujeres sanas asintomáticas en edad reproductiva. Ravel y colaboradores (2011) realizaron un estudio con 396 mujeres norteamericanas asintomáticas de cuatro grupos étnicos (caucásica, afroamericana, hispana y asiática) determinando que las mujeres hispanas y afroamericanas presentaban una mayor abundancia de bacterias anaeróbicas en comparación con las mujeres de etnia caucásica y asiática (Figura 2).

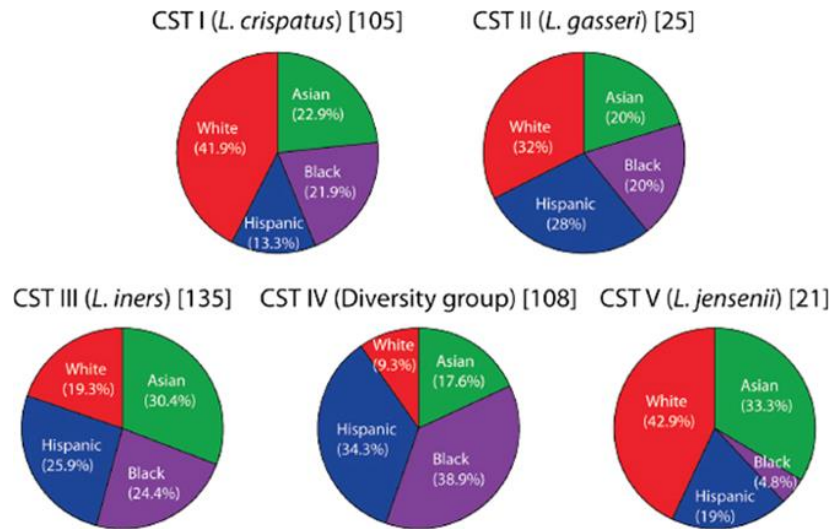


Figura 2. Representación de tipos de estado comunitarios vaginales sanos dentro de cada grupo étnico de mujeres en edad reproductiva (Tomado de Ravel *et al.*, 2011).

Se ha establecido que existen al menos cinco tipos de estado comunitario (CST por sus siglas en inglés). Cuatro de estos CST están dominados por *Lactobacillus crispatus* (CSTI), *Lactobacillus gasseri* (CSTII), *Lactobacillus iners* (CSTIII), y *Lactobacillus jensenii* (CSTV), CSTIV está compuesto por una amplia gama de bacterias anaeróbicas (Ravel *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2014; Ma & Li, 2017). Este estado comunitario (CSTIV) carece de una alta proporción de lactobacilos y se define como el estado de diversidad dominado por bacterias anaerobias y microaerófilas y se correlaciona con un pH vaginal más alto y disbiosis (Łaniewski y Herbst-Kralovetz, 2018).

Durante el periodo reproductivo de la mujer, los niveles de hormonas que regulan el ciclo menstrual influyen en la estructura de la microbiota vaginal (Farage *et al.*, 2010). Existen otros factores que podrían modificar la microbiota vaginal como el tabaquismo, la etnia, duchas vaginales, tratamientos médicos, actividad sexual y la presencia de cáncer de cuello uterino (Figura 3) (Leyva-Gómez *et al.*, 2019; Kwon y Lee, 2022).

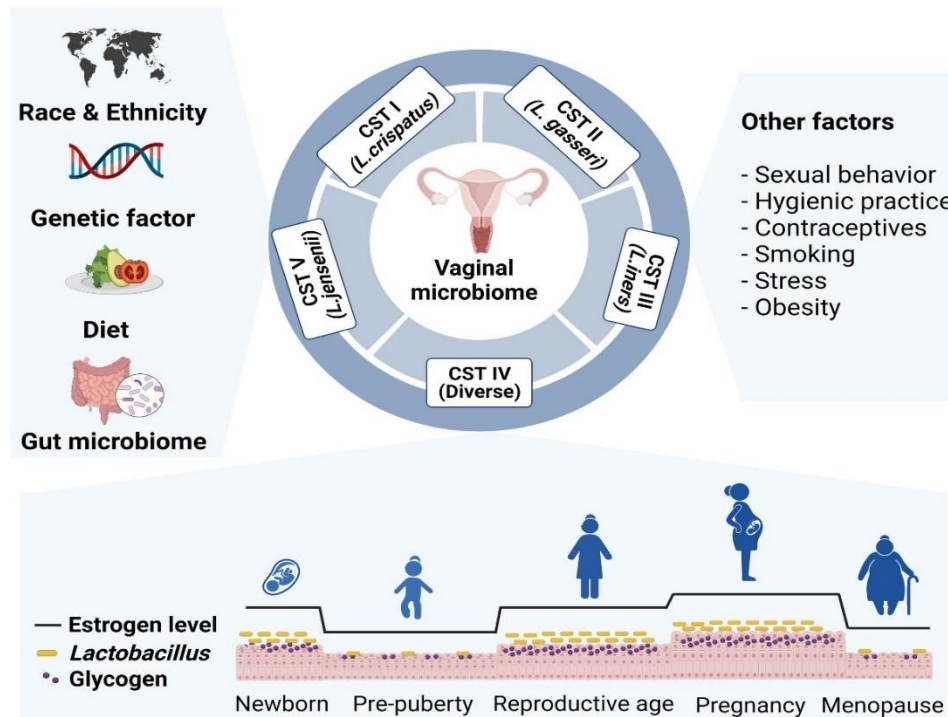


Figura 3. Factores intrínsecos y extrínsecos que afectan a la comunidad microbiana vaginal. Las niñas prepúberes y las mujeres posmenopáusicas tienen una abundancia relativamente baja de especies de *Lactobacillus* (Tomado de Kwon y Lee, 2022).

Se describe a las especies de *Lactobacillus* como las más abundantes de una microbiota vaginal sana, pero algunos estudios indicaron que especies de los géneros *Gardnerella*, *Sneathia*, *Atopobium* y *Prevotella*, son predominantes en algunas mujeres sanas afroamericanas (Fettweis *et al.*, 2014).

2.4 Microbiota Vaginal

La microbiota vaginal se refiere a la comunidad de organismos fúngicos en el tracto reproductivo femenino inferior y consiste principalmente en microorganismos de la división *Ascomycota* y *Basidiomycota*. (Lehtoranta *et al.*, 2021).

El papel de *Candida* se ha reconocido durante mucho tiempo en la vagina como colonizadores del epitelio genital sin causar infección; se ha demostrado que la especie *Candida albicans*, se

encuentra en las vías vaginales de 20 a 70 % de mujeres sanas asintomáticas. Sin embargo, la disbiosis, junto con defectos inmunitarios conduce a la candidiasis vulvovaginal, una de las formas más comunes de vaginitis infecciosa (Abou Chacra & Fenollar, 2021; Belvonicova *et al.*, 2022). La diversidad fúngica que se ha reportado varía de acuerdo a la metodología de identificación, así la aproximación con técnicas moleculares ofrece resultados más detallados de la diversidad fúngica que otras técnicas como el cultivo (Restrepo-Rivera *et al.*, 2021).

Drell y colaboradores en 2013 caracterizaron el microbioma de 251 mujeres sanas caucásicas en edad reproductiva y determinaron que 58% de las secuencias pertenecían a la división *Ascomycota*, *Basidiomycota* se detectó en menor proporción (3%). Dentro de *Ascomycota*, se observó el orden Saccharomycetales (dominado por el género *Candida*), Capnodiales, Eurotiales, Pleosporales y Helotiales (Figura 4).

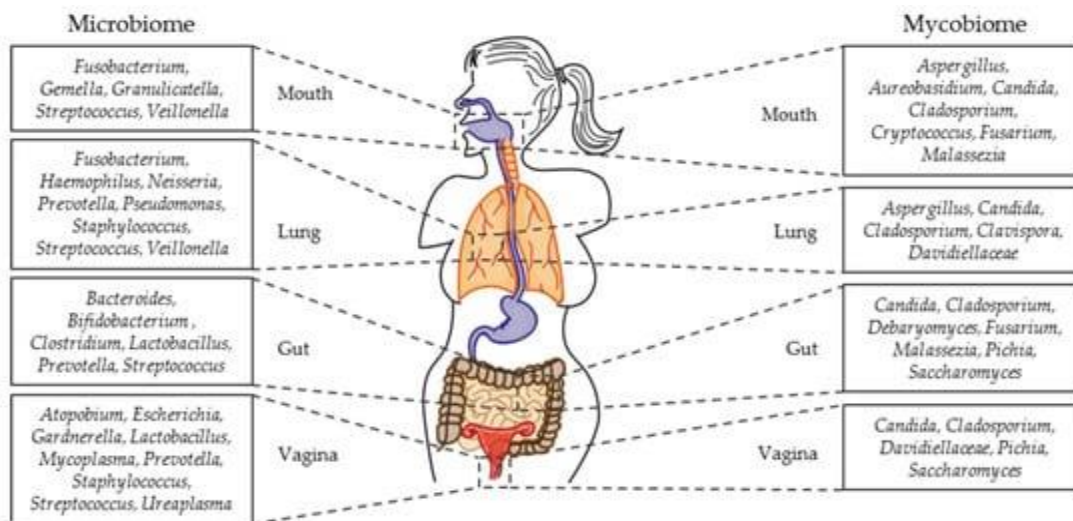


Figura 4. Micobiota y microbiota en diferentes sitios anatómicos (tomado de Krüger *et al.*, 2019).

2.5 Microbiota Vaginal en el Embarazo

El embarazo es un estado de diversos cambios fisiológicos para adaptar el feto al cuerpo humano y viceversa. Este estado diversificado se rige por cambios hormonales que conducen a la

modulación inmunitaria, cambios de comportamiento, cambios fisicoquímicos en la mucosa y cambios en el tracto genital (Gupta *et al.*, 2020).

El microbioma vaginal sufre cambios significativos durante el embarazo, incluida una disminución en la diversidad, una mayor estabilidad y un enriquecimiento con especies de *Lactobacillus* (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2016). Debido a los niveles elevados de estrógeno, las especies de *Lactobacillus* dominan el microbioma vaginal durante el embarazo (Romero *et al.*, 2014). El estrógeno (estradiol) aumenta a lo largo de la gestación y conduce a aumentos en los niveles de glucógeno; el glucógeno se metaboliza en ácido láctico, la disminución del pH permite el incremento de *Lactobacillus* (Prince *et al.*, 2015).

Li *et al.*, (2020) analizaron el microbioma vaginal de 12 mujeres embarazadas de etnia asiática y concluyeron que *Lactobacillus* es el género dominante y que la composición de especies es relativamente constante durante el embarazo normal (Li *et al.*, 2020).

Doyle *et al.*, (2018) obtuvieron muestras vaginales de una cohorte de mujeres de Malawi entre 5 y 583 días después del parto y se demostró que *Lactobacillus* estaba presente en menos de un tercio de las mujeres (27.1%), las cuales fueron muestreadas en un periodo menor a 20 días después del parto, mientras que las pacientes con un microbioma con baja dominancia de *Lactobacillus* fueron muestreadas en un periodo de 200 días después del parto (Doyle *et al.*, 2018). Las comunidades vaginales eran similares a las de los tipos de estado comunitario (CST) III y IV, según lo definido por Ravel y colaboradores en 2011, asociando estos resultados a la prevalencia de VB en Malawi, debido a que presenta una incidencia entre el 35 % y el 85.5 %.

MacIntyre *et al.*, (2015) describieron el microbioma vaginal de pacientes embarazadas por medio de la secuenciación ARNr 16S, los autores reportaron a *Lactobacillus* como el género dominante y una baja diversidad (<2 en el índice de Simpson).

La baja abundancia de *Lactobacillus* en el microbioma vaginal se asocia con complicaciones del embarazo, en particular, un mayor riesgo de parto prematuro. En promedio 40% de los partos prematuros se deben a una infección (Gudnadottir *et al.*, 2022), como por ejemplo, *Gardnerella vaginalis* (Callahan *et al.*, 2017), mientras que los datos del Proyecto del Microbioma Humano (HMP) indicaron una menor abundancia de *Lactobacillus crispatus* vaginal se asocia también a casos de parto prematuro (Amir *et al.*, 2020).

Se ha reportado que la causa más frecuente de infección bacteriana representa la vía ascendente desde la vagina a través del cuello uterino y hacia el útero, donde las bacterias provocan deciduitis

y corioamnionitis (Hočevár *et al.*, 2019). Estas afecciones desencadenan cascadas inflamatorias y provoca una ruptura prematura de las membranas fetales (Bayar *et al.*, 2020).

Los factores relacionados con el estilo de vida, como la dieta y la obesidad, pueden afectar a la microbiota vaginal aumentando su diversidad (Houttu *et al.*, 2022). En trabajos recientes se ha postulado que la composición de la microbiota vaginal difiere según el estado de la diabetes mellitus gestacional (Cortez *et al.*, 2019).

Factores como infecciones virales pueden afectar el microbioma vaginal. Se ha identificado la variante del SARS-CoV-2 (causante del COVID-19) en la mucosa vaginal (Kirtsman, 2020). En 2022 Celik y colaboradores caracterizaron el microbioma vaginal de mujeres embarazadas con SARS-CoV-2, estableciendo que la composición de la microbiota vaginal se ve afectada desfavorablemente por la enfermedad de COVID-19 y que existe una disbiosis prominente durante la infección activa por COVID-19. Esto se determinó al encontrar una disminución de *Lactobacillus crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* y *L. jensenii*.

Después del parto, los niveles de estrógeno disminuyen drásticamente lo que provoca cambios en la composición del microbioma vaginal, caracterizado por una reducción de *Lactobacillus* y un aumento de la diversidad alfa (Kervinen *et al.*, 2019).

2.6. Disbiosis Vaginal

La disbiosis vaginal (DV) se define como un microbioma que no está dominado por bacterias del género *Lactobacillus* (Van de Wijgert & Jaspers, 2017). Esto viene acompañado por una sustitución gradual o total de bacterias anaerobias del género *Candida*, *Mobiluncus*, *Bacteroides* y especies como *Gardnerella vaginalis*, y *Mycoplasma hominis* (Losa *et al.*, 2022). Con la disminución de *Lactobacillus* el pH vaginal no se mantiene en el rango normal (3.5–4.5), lo que crea una cascada de eventos indeseables en el huésped, incluida una infección persistente potencialmente causada por una combinación de factores (Joseph *et al.*, 2021).

La VB ocurre debido a una disbiosis microbiana, presentando un microbioma vaginal diverso, caracterizado por microorganismos anaerobios, específicamente *G. vaginalis* (Zaki *et al.*, 2010).

La VB presenta una prevalencia que oscila entre el 23 y el 29% y es mayor en mujeres

afroamericanas (33.2%) e hispanas (30.7%) (Peebles *et al.*, 2019). El diagnóstico se complica porque las pacientes en su mayoría son asintomáticas (Muzny y Schwebke, 2020). La VB sintomática puede describirse como un síndrome basado en la presencia de características clínicas (secreción y/o mal olor) interpretadas por los criterios de Amsel (Cuadro 3) o tinción de Gram (puntuación de Nugent, Cuadro 4) (Lev-Sagie *et al.*, 2022).

Cuadro 3. Criterios de Amsel para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana, tres de los cuatro criterios anteriores deben estar presentes para confirmar el diagnóstico (Amsel *et al.*, 1983).

| Criterios de Amsel |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Secreción fina, blanca, amarilla y homogénea.• Células clave en microscopía• pH del fluido vaginal mayor de 4.5 al colocar la descarga en papel tornasol• Libere olor a pescado después de agregar una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10 % a la preparación húmeda, también conocida como "prueba de olor". |

El sistema de puntuación de Nugent usaba como el método estándar para el diagnóstico de la VB (Bhujel *et al.*, 2021). La metodología consiste en analizar frotis vaginales en un portaobjetos microscópico en inmersión en aceite, y se examinan un mínimo de 10 campos de alta potencia para tres morfotipos de bacterias: *Lactobacillus*, *Gardnerella* y bacilos de gram curvos. Cada una de estas tres categorías recibe una puntuación basada en el número de bacterias contadas. Posteriormente, estas tres puntuaciones se suman para obtener una puntuación total que oscila entre 0 y 10 (Cuadro 4) (Colonna & Steelman, M. 2019; Van den Munckhof *et al.*, 2019).

La epidemiología de la VB sugiere que puede adquirirse por transmisión sexual y está asociada con algunos factores de riesgo, que incluyen duchas vaginales y tabaquismo (Ranjit *et al.*, 2018). Las pautas internacionales proponen tratar a las mujeres diagnosticadas con VB con antibióticos (metronidazol, clindamicina o, alternativamente, tinidazol) por vía oral o intravaginal (Tomás *et al.*, 2020; Zwittink *et al.*, 2021). Las tasas de curación notificadas para un episodio de VB aguda varían, pero se estima que oscilan entre el 70 y el 80% (Jones, 2019).

Cuadro 4. Puntuación de Nugent para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana, 0: No morfotipos presentes, 1+: < de un morfotipo presente, 2+: 1 a 4 morfotipos presentes, 3+: 5 a 30 morfotipos presentes, 4+: 30 o más morfotipos presentes (Nugent *et al.*, 1991; Parra, 2015).

| Puntuación | <i>Lactobacillus</i> | <i>Gardnerella y Bacteroides</i> | <i>Mobiluncus</i> |
|------------|----------------------|----------------------------------|-------------------|
| 0 | 4+ | 0 | 0 |
| 1 | 3+ | 1+ | |
| 2 | 2+ | 2+ | 1+ o 2+ |
| 3 | 1+ | 3+ | 3+ o 4+ |
| 4 | 0 | 4+ | |

La reacción en cadena polimerasa en tiempo real cuantitativa (qPCR) es una herramienta reproducible y fiable que mide la presencia de bacterias presentes en la VB, como *Atopobium vaginae*, *G. vaginalis*, *Sneathia spp.*, *Megasphaera spp.*, y *Mobiluncus spp.* (Breding *et al.*, 2020). Otro patógeno importante que causa DV es *Trichomonas vaginalis* (TV), el cual causa la enfermedad de transmisión sexual tricomoniasis (Zaki *et al.*, 2010). La mayoría de las mujeres (85%) y los hombres (77%) con TV son asintomáticos (Seña *et al.*, 2007; Sutton *et al.*, 2007). Un tercio de las mujeres asintomáticas se vuelven sintomáticas dentro de los seis meses posteriores a la infección. Los síntomas incluyen secreción uretral y disuria (Kissinger, 2015).

Chlamydia trachomatis es una bacteria Gram-negativa intracelular obligada que puede replicarse solo dentro de una célula huésped, generalmente es asintomática en las mujeres (Van Gerwen *et al.*, 2022). La OMS estimó que 50 millones de mujeres se infectaron con *C. trachomatis*, de las cuales 34 millones se encontraban en el África subsahariana y el sur/sureste de Asia (World Health Organization, 2011). Si no se trata, la infección por *C. trachomatis* puede provocar enfermedad inflamatoria pélvica, embarazo ectópico e infertilidad tubárica (Tamarelle *et al.*, 2019). Esta infección también se asocia con resultados adversos del embarazo como corioamnionitis, parto prematuro y aborto fetal (Reekie *et al.*, 2018).

Dado que *C. trachomatis* es una infección fácilmente curable, los programas de detección prenatal que identifican y tratan a las mujeres infectadas podrían prevenir muchas de estas complicaciones neonatales y del embarazo (Adachi *et al.*, 2016). Se recomienda una dosis única de 1 g por vía oral de azitromicina como tratamiento de primera línea para la clamidia en el embarazo, con un ciclo de amoxicilina o eritromicina como opciones alternativas. Algunos autores han sugerido que los macrólidos, como la eritromicina y la azitromicina (World Health Organization, 2016), también

pueden ser beneficiosos para prevenir resultados adversos del embarazo al suprimir el factor de necrosis tumoral alfa, que se ha implicado en la inducción del parto prematuro (Adachi *et al.*, 2021). Los estudios *in vitro* mostraron que *Lactobacillus* podría prevenir la colonización de *Chlamydia* manteniendo un ambiente ácido y consumiendo glucosa (Nardini *et al.*, 2016). Por lo tanto, los antibióticos con probióticos pueden ejercer un efecto favorable sobre la infección por *C. trachomatis* al mejorar la microbiota vaginal (Han *et al.*, 2018).

2.7. *Lactobacillus Iners*

Lactobacillus iners se describió por primera vez en 1999 de muestras vaginales y del tracto urinario. Se cultivó una especie de *Lactobacillus* denominada “L. 1086V”, la cual sólo el 9% de los aislados produjeron peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en comparación al 95 y 94% de los aislados de *L. crispatus* y *L. jensenii*, respectivamente. Más tarde recibió el nombre de *L. iners* (Antonio *et al.*, 1999; Falsen *et al.*, 1999; Atassi *et al.*, 2006).

La microbiota vaginal dominada por *L. crispatus* (CST I) se asocia con una vagina sana, mientras que un microbioma dominado por *Lactobacillus iners* (CST III) es más propenso a la disbiosis vaginal (Jakobsson *et al.*, 2007). Estudios han demostrado que el efecto protector de *Lactobacillus* contra las ITS y la VB están asociados con la capacidad de producir ácido láctico y bacteriocinas que mantienen el estado saludable de la vagina (Fuochi *et al.*, 2019).

L. crispatus, *L. gasseri* y *L. jensenii* pueden producir ácido D- y L-láctico al fermentar glucógeno, mientras que *L. iners* solo puede producir ácido L-láctico porque carece del gen que codifica para D-lactato deshidrogenasa (France *et al.*, 2016). La cepa AB-1 de *L. iners* presenta el genoma de *Lactobacillus* más pequeño determinado hasta ahora, que consta de un solo cromosoma de ~1.3 Mbp (Vanechoutte, 2017). Debido a la ausencia de ácido D-láctico, la proporción de ácido L-láctico es insuficiente para inhibir la progresión de patógenos (Zheng *et al.*, 2021).

Aunque la presencia de *L. iners* sigue siendo objeto de debate, parece que su abundancia permanece relativamente constante y no es desplazada por patógenos. En casos de VB, *L. iners*, en lugar de *L. crispatus*, suele coexistir con otras bacterias potencialmente dañinas. La notable capacidad para sobrevivir en diversas condiciones indica que esta especie puede ser un miembro importante de la

defensa del huésped y puede ser un *Lactobacillus* simbiótico persistente (Petrova *et al.*, 2017; Chee *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2021).

2.8 Microbioma Vaginal y su Relación con la Diabetes Mellitus Gestacional

El embarazo se caracteriza por varios cambios metabólicos que promueven la acumulación de tejido adiposo en los primeros meses, seguido de un aumento de la lipólisis con el avance de la edad gestacional (Grimes *et al.*, 2000). La capacidad de la insulina para suprimir la lipólisis disminuye hacia el final del embarazo y se reduce aún más en mujeres con DMG, lo que contribuye a un aumento de los ácidos grasos libres posprandiales, a la producción de glucosa hepática y resistencia a la insulina (Plows *et al.*, 2018). Dado que la DMG se asocia con un control metabólico deficiente, un índice de masa corporal más alto y una función leucocitaria alterada algunos estudios han sugerido que la DMG se podría asociar con alteraciones de la microbiota e infección vaginal (Mazziotti *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2018). Un entorno hiperglucémico podría aumentar el riesgo de la proliferación y adherencia de bacterias patógenas y levaduras al tejido genital (Nyirjesy y Sobel, 2013); sin embargo, son pocos estudios que abordan esta asociación.

Zhang *et al.*, (2018) analizaron secreciones vaginales de mujeres de etnia asiática (11 sanas y 11 con DMG). Los autores reportan diferencias en la abundancia relativa de las especies de *L. crispatus* 28.5%, *L. iners* 20.9% y *L. acidophilus* 13.7% en pacientes sanas, y *L. acidophilus* 28.3%, *L. crispatus* 15.1%; y *L. iners* 12.8% en pacientes con DMG. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la frecuencia de VB entre pacientes con DMG y mujeres embarazadas sanas (Zhang *et al.*, 2018).

Cortez y colaboradores en 2019 analizaron el microbioma vaginal, oral e intestinal de 26 mujeres embarazadas con DMG y 42 pacientes embarazadas sanas, determinando que el análisis del microbioma oral no mostró diferencias significativas en filos y géneros entre los grupos estudiados. Por el contrario, las pacientes con DMG presentaron una composición de microbioma vaginal e intestinal específica, que fue menos diversa que las encontradas en pacientes sanas, mostrando géneros relacionados con la DV (*Staphylococcus*, *Megasphaera* y *Enterococcus*.) (Cortez *et al.*, 2018). La exploración de las alteraciones del microbioma vaginal de las mujeres con DMG podría

ayudar en la detección temprana y el tratamiento de la disbiosis para evitar resultados adversos en el embarazo (Rafat, 2022).

3. JUSTIFICACIÓN

Durante el embarazo, el aumento en los niveles de progesterona y estrógenos mantiene las estructuras microbianas estables, de baja riqueza y diversidad dominadas por *Lactobacillus* spp. La DMG provoca un desequilibrio hormonal asociándose con un mayor riesgo de complicaciones maternas como el parto prematuro espontáneo, ruptura prematura de membranas y corioamnionitis, por lo tanto, esta enfermedad podría ser un factor en la alteración de la microbiota cervicovaginal. Hasta la fecha no existen estudios que confirmen esta asociación, por lo que es importante realizar una investigación utilizando tecnología de nueva generación para atender este problema de salud pública, el cual está presente en aproximadamente 30% de la población mexicana. De existir alguna asociación entre la DMG y la microbiota cervicovaginal, en un futuro las mujeres que padezcan esta enfermedad podrían recibir una mejor atención ginecológica.

4. HIPÓTESIS

Dado que la Diabetes Mellitus Gestacional genera un ambiente hiperglucémico en el epitelio vaginal, esto alterará la estructura de la microbiota cervicovaginal causando una disbiosis.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

- Determinar si existen cambios en la microbiota vaginal que se asocien a condiciones de disbiosis en las mujeres que presentan DMG.

5.2. Objetivos Específicos

- Identificar los principales grupos taxonómicos a nivel filo, género y especie en mujeres gestantes sanas y mujeres con DMG.
- Realizar un análisis de metagenómica funcional para el estudio integral del microbioma y de las interacciones huésped-microbioma.
- Definir los tipos de estado comunitario (CSTs) en mujeres gestantes sanas y mujeres con DMG.
- Comparar el rendimiento de la secuenciación shotgun y la secuenciación ARNr 16S a nivel género.

6. METODOLOGÍA

6.1. Participantes del Estudio y Muestreo

El reclutamiento de las pacientes que proporcionaron la muestra cervicovaginal, además de la entrega y firma del consentimiento informado se realizó por medio de médicos especialistas del Colegio de Ginecología (COGOMAZ) en Mazatlán, Sinaloa, México (Anexo 1). Los médicos especialistas proporcionaron información de contacto y su cedula profesional, además se obtuvo una copia del historial clínico.

Las mujeres que padecían DMG fueron diagnosticadas entre la semana 24 a 33 de gestación de acuerdo con los criterios de diagnóstico de la OMS (World Health Organization Guideline, 2013) (Cuadro 5). Las pacientes fueron agrupadas en dos categorías: el grupo DMG y el grupo control (sin DMG).

Los criterios de inclusión fueron presentar embarazo único, edad mayor a 28 años, diagnóstico de diabetes gestacional en la semana 24 a 33 de gestación, mientras que los criterios de exclusión del estudio fueron las pacientes que presentaban muerte intrauterina, embarazos múltiples, enfermedades o infecciones de transmisión sexual, tratamiento antibiótico, hormonal y/o reproducción asistida.

Cuadro 5. Criterios médicos para el diagnóstico de la DMG de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2013). * Hemoglobina glucosilada

| Curva de tolerancia a la glucosa con carga de 75 gr |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Glucosa en ayuno: ≥ 92 mg/dL• A la hora ≥ 180 mg/dL• A las dos horas ≥ 153 mg/dL• Insulina en ayuno: > 8 uU/mL• HbAc1* >5.6 |

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del CIAD (CE/002/2020) (Anexo 1).

Para la validación estadística del cuestionario, se utilizó el programa SigmaPlot (v12.0), Las diferencias entre los grupos evaluadas (control y DMG) se realizo con la prueba de Fisher ($p < 0.05$). La toma de muestra se realizó el día de la cita de cada paciente para su control prenatal, entre la semana 24 a 33 de embarazo por medio de un médico especialista. Para obtener la muestra se introdujo una citobrocha en el canal endocervical y se giró 360 grados en dirección de las manecillas del reloj de 3 a 5 veces (el procedimiento se describe en la figura 5), posteriormente se insertó en un frasco estéril con etanol al 96%; las muestras se transportaron por medio de una hielera y se almacenaron a -80°C en un ultracongelador hasta su procesamiento.

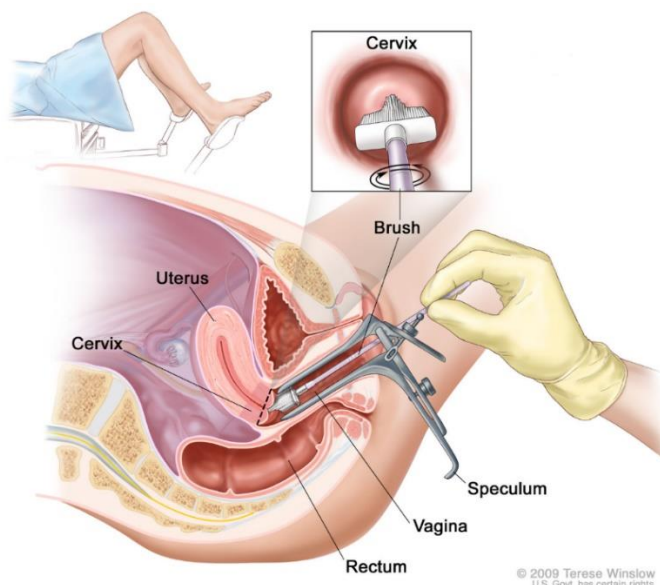


Figura 5. Procedimiento a seguir para la toma de frotis de la mucosa cervicovaginal (Tomado de Winslow, 2009).

6.2 Aislamiento de ADN Bacteriano

El ADN microbiano total se extrajo utilizando el kit QIAamp DNA extraction mini Kit de QIAGEN (QIAGEN®, Hilden, DEU) siguiendo las instrucciones del fabricante las cuales se encuentran en el anexo 2.

6.3 Concentración e Integridad de ADN

La concentración de ADN total se determinó por medio de un NanoDrop (DeNovix Inc, Wilmington, DE), se colocó 1 μL de la muestra y se registró la concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$) a 260 nm y su pureza en relación a 260/280 nm. Posteriormente se realizó una dilución de 1:10 y las muestras se almacenaron a -20°C .

Para analizar la integridad del ADN se corrió una electroforesis en un gel con una concentración de 0.7% por 35 minutos a 90 V (Figura 6).

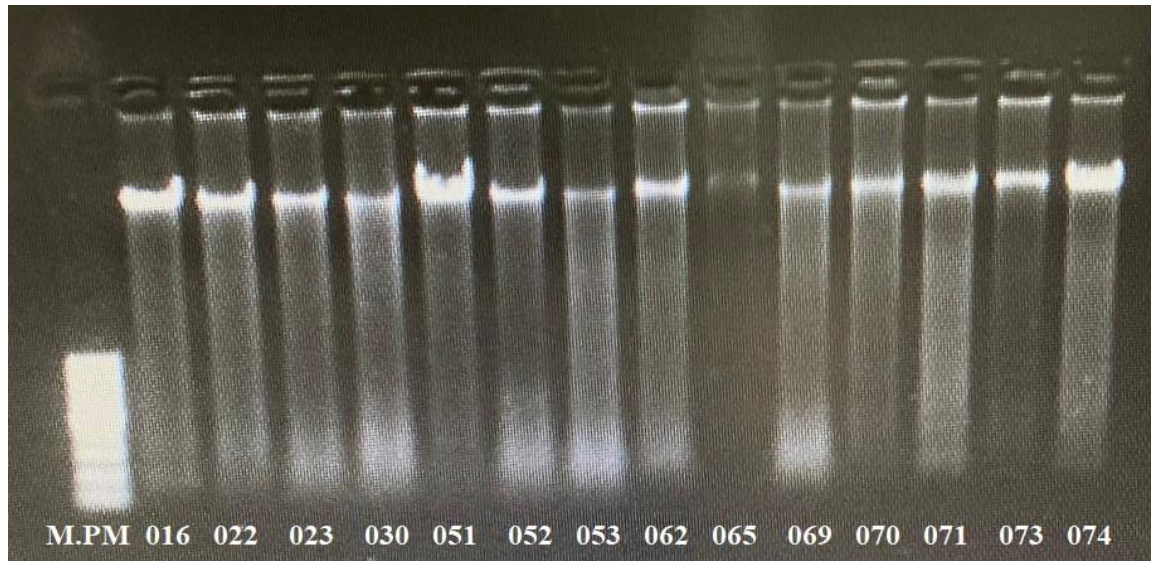


Figura 6. Integridad del ADN extraído de muestras cervicovaginales por medio del kit QIAmp (QIAGEN). MPM indica el marcador de peso molecular. Los números identifican a las pacientes que participaron en este estudio.

6.4 Amplificación del Gen ARNr 16S por Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)

La región hipervariable V3 de tamaño ~ 150 pb del gen 16S ARNr fue amplificada por PCR punto final (Cuadro 6). El protocolo de amplificación fue de un ciclo a 95°C / 3 min, seguido de 35 ciclos de 95°C / 30 s, 58°C / 30 s, 72°C / 30 s y un ciclo final de 72°C / 5 min.

Cuadro 6. Reactivos utilizados en la PCR punto final.

| Reactivos | 1x |
|---------------------------|----------------|
| • H ₂ O | 8.4 µL |
| • Buffer 5x | 1.5 µL |
| • MgCl ₂ 25 mM | 1.6 µL |
| • dNTPs 2.5 mM | 0.6 µL |
| • Primer Forward 10 µM | 0.6 µL |
| • Primer Reverse 10 µM | 0.6 µL |
| • Enzima Taq polimerasa | 0.1 µL |
| Total: | 13.4 µL |

La preparación de la mezcla maestra se utilizó la Taq Clontech Advantage® 2 Polymerase Mix con los primers que se muestran en la Cuadro 7. Cada reacción fue de 13.4 µL y se añadió 1 µL de ADN (14.4 µL), se incluyó un control negativo y un positivo. Para la visualización de la ampliación, se preparó un gel de agarosa al 2% y se realizó una electroforesis a 90 V por 30 minutos.

Cuadro 7. Secuencias de los Primers V3 (indicados en rojo) con sus adaptadores Illumina (Huse *et al.*, 2008).

| | |
|-------------|---|
| 16s_V3_338f | 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG ACYCCTACGGGRGGCAGCAG '3 |
| 16s_V3_533r | 3' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG TTACCGCGGCTGCTGGCAC '5 |

6.5 Preparación de Bibliotecas y Secuenciación

La preparación de bibliotecas se llevó a cabo en la plataforma Illumina miniseq (San Diego, CA) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante y de acuerdo a Enciso (2019) el cual se describe brevemente.

6.5.1 Tagmentación e Indexación

La tagmentación es el paso inicial en la preparación de librerías donde el ADN no fragmentado se escinde para su análisis, la fragmentación del ADN se realizó mediante una técnica enzimática

(Nextera Illumina). Este método realiza cortes al azar en el ADN y al mismo tiempo añade una parte del adaptador. El resto del adaptador e índices (1(i7) y 2(i5)) se añadieron por una PCR de 18 ciclos.

El ADN se ajustó a una concentración de 2 ng/μL y se agregó a un tubo de PCR 2.5 μL de Tagment DNA Buffer (TD) junto con 2 μL del ADN ajustado a 2 ng/μL y se homogenizo por pipeteo. A la mezcla se le agregó 1 μL de Amplicon Tagment Mix (ATM), se mezcló por pipeteo y se centrifugo a 280 fuerzas-g (RCF) por 1 minuto. Se ejecutó el siguiente programa de PCR: 55°C por 5 minutos, mantener 10°C. Para detener la reacción de tagmentación se agregó 1 μL de Neutralize tagment buffer (NT) y posteriormente se centrifugo a 280 fuerzas-g (RCF) por 1 minuto e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Para la indexación de las muestras se agregaron 1.7 μL de cada índice y 3 μL de master mix NPM, se mezcló por pipeteo, posteriormente se centrifugó a 280 fuerzas-g (RCF) por 1 minuto, después se realizó una PCR. El protocolo de amplificación fue de un ciclo a 72°C por 3 minutos, 95°C /30 segundos (s), seguido de 18 ciclos de: 95°C /10 s, 55°C / 30 s, 72°C / 30 s y se mantuvo a 10°C.

6.5.2. Purificación de Amplicones con Perlas Magnéticas Ampure

Se utilizaron las perlas Ampure XP beads a temperatura ambiente y se agitaron por medio de un vórtex por 30 segundos para resuspenderlas. Se agregaron 0.6 μL de perlas Ampure XP beads por cada μL de muestra tagmentada con la finalidad de obtener fragmentos menores a 300 pb, se mezcló lentamente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se colocaron en la gradilla magnética por 2 minutos, sin retirar el tubo de la gradilla y se retiró el sobrenadante de cada tubo con ayuda de una micropipeta cuidando de no tocar las perlas magnéticas.

Se realizó un lavado con 200 μL de etanol al 80% y se incubó por 30 segundos a temperatura ambiente y se retiro el sobrenadante con una micropipeta. Los tubos se destaparon de 8 a 10 minutos para que se volatizara el etanol, después, se adicionaron 15 μL de Tris 10 Mm pH 8 o agua libre de nucleasas a cada tubo y se mezcló 10 veces aproximadamente para resuspender la muestra. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 2 minutos, se colocaron los tubos nuevamente en la gradilla magnética por 2 minutos o hasta que se aclaró la muestra. Se transfirieron 14 μL del

sobrenadante a un tubo limpio de 0.2 mL y se almacenó a 4°C. El producto final del purificado se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

6.5.3 Preparación del Pool

Las bibliotecas se diluyeron utilizando buffer de resuspensión RSB, Tris 10 mM pH 8.5 o agua libre de nucleasas a 10nM. Se tomó 5 µl de ADN diluido de cada librería y se agruparon con índices dependiendo del tamaño de las librerías. El pool purificado se utilizó a 4 nM.

Las bibliotecas se desnaturalizaron con NaOH 0.2 N (5 µl del pool purificado 4 nM y 5 µl de NaOH 0.2 N), se mezcló la solución por medio de un vórtex y se centrifugó a 280 fuerzas-g (RCF) por 1 minuto, después se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente con el fin de desnaturalizar el ADN. La biblioteca desnaturalizada se preparó a 20 pM con 10 µl de ADN desnaturalizado y 990 µl del Buffer de hibridación HT1.

El ADN desnaturalizado a 20 pM se colocó en hielo hasta que estuviera listo para proceder a la dilución final.

6.5.4 Dilución y Desnaturalización del Control PhiX 10 nM.

La biblioteca Phix se preparó a 4 nM al mezclar 2 µl de control Phix 10 nM con 3 µl de agua libre de nucleasas. Para desnaturalizar el control PhiX 4 nM con NaOH 0.2 N, realizó la siguiente proporción: 5 µl de control Phix 4 nM con 5 µl de NaOH 0.2 N y se homogenizó la solución mediante vórtex. Posteriormente se centrifugó a 280 fuerzas-g (RCF) por 1 minuto.

Para desnaturalizar la librería se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La librería desnaturalizada se preparó a 20 pM de la siguiente manera: 10 µl del control PhiX se mezcló con 990 µl del Buffer de hibridación HT1. El ADN desnaturalizado a 20 pM se colocó en hielo para proceder a la dilución final. Una vez combinadas las librerías, se diluyó el pool final de 20 pM a 2 pM. Para obtener la concentración deseada se mezclaron los siguientes volúmenes: 60 µl de pool

final a 20 pM con 540 µl de buffer de hibridación HT1. El pool final se colocó en hielo, para proceder con la desnaturalización térmica.

La desnaturalización térmica se realizó antes de cargar la librería en el cartucho de reactivo del equipo Illumina Miniseq, con la finalidad de asegurar una carga eficiente en la celda de flujo y el pool final se incubó a 96°C durante 2 minutos. Después de la incubación, el tubo se invirtió 1 o 2 veces para mezclar, posteriormente se colocó el tubo en agua con hielo por 5 minutos. Para finalizar se cargaron 500 µl del pool final en el cartucho de reactivo del equipo Illumina Miniseq.

6.6 Análisis Bioinformático y Estadístico de la Amplificación del Gen ARNr 16S

La secuenciación (paired-end, ~150 bp) de los fragmentos se realizó en la plataforma MiniSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) en el CIAD-Mazatlán. Se obtuvieron los archivos en formato FASTQ y las secuencias fueron analizadas de acuerdo al protocolo de la paquetería Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2 v1.24.0; Callahan *et al.*, 2016), el cual se describe brevemente; Las secuencias fueron filtradas eliminando lecturas cortas menores a 150 pb y bases con una calidad Phred inferior a Q30. Las secuencias libres de quimeras fueron utilizadas para generar las variantes de secuencias de amplicón (ASV por sus siglas en inglés). La Asignación taxonómica fue implementada con la base de datos SILVA v138 (Quast *et al.*, 2013). Los análisis fueron realizados en el lenguaje R v4.2.1, e implementados en RStudio v4.2.1.

Para evaluar la secuenciación y comparar la riqueza observada entre comunidades que habían sido muestreadas de forma desigual se realizó una curva de rarefacción con el paquete Ranacapa v0.1.0 (Kandlikar *et al.*, 2018). Los análisis de abundancia relativa se calcularon a nivel de familia, la gráfica de abundancia relativa fue generada con las 20 familias más abundantes. La diversidad alfa fue calculada con el índice de Shannon-Wiener y Chao 1, los cuales contemplan la riqueza y abundancia de las especies (Cuadro 7). La estructura de la población (diversidad beta) se calculó con la distancia UniFrac (ponderada y no ponderada), y se implementó con los análisis de coordenadas principales (PCoA). Los análisis se realizaron por medio de los paquetes Phyloseq v1.40.0 (McMurdie y Holmes, 2013), DECIPHER v2.24.0 (Wright, 2016), Phangorn v.2.10.0 (Schliep, 2011) y Vegan (v2.6-2; Oksanen, *et al.*, 2019). Las gráficas fueron generadas con ggplot2 v3.3.6 (Wickham H. 2016).

Cuadro 8. Índices de diversidad alfa.

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F_1(F_1-1)}{2(F_2+1)}$$

Índice Chao 1: Donde S_{obs} es el número de OTUs observados, F₁ es el número de singletons (OTUs observados una vez), y F₂ es el número de doubletons (OTUs observados dos veces).

$$H = -\sum_{i=1}^s (p_i \ln p_i)$$

Índice Shannon-Wiener: Donde s es el número de OTUs y P_i es la abundancia proporcional de la especie.

Para determinar las diferencias estadísticas en la diversidad entre las pacientes (DMG vs grupo control), los valores obtenidos con los índices de Shannon y Chao 1 fueron evaluados con ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y para determinar diferencias significativas de la abundancia de las lecturas se realizó la prueba t de Student (t-test) ($p < 0.05$), el análisis se implementó en SigmaPlot (v12.0) y R (v4.2.1). Para la diversidad beta se realizó un análisis de varianza multivariada (PERMANOVA) ($p < 0.05$) con 999 permutaciones para pruebas de significancia utilizando la función adonis implementada en el paquete Vegan v2.6-2 (Oksanen, *et al.*, 2019) del lenguaje R, implementado en RStudio.

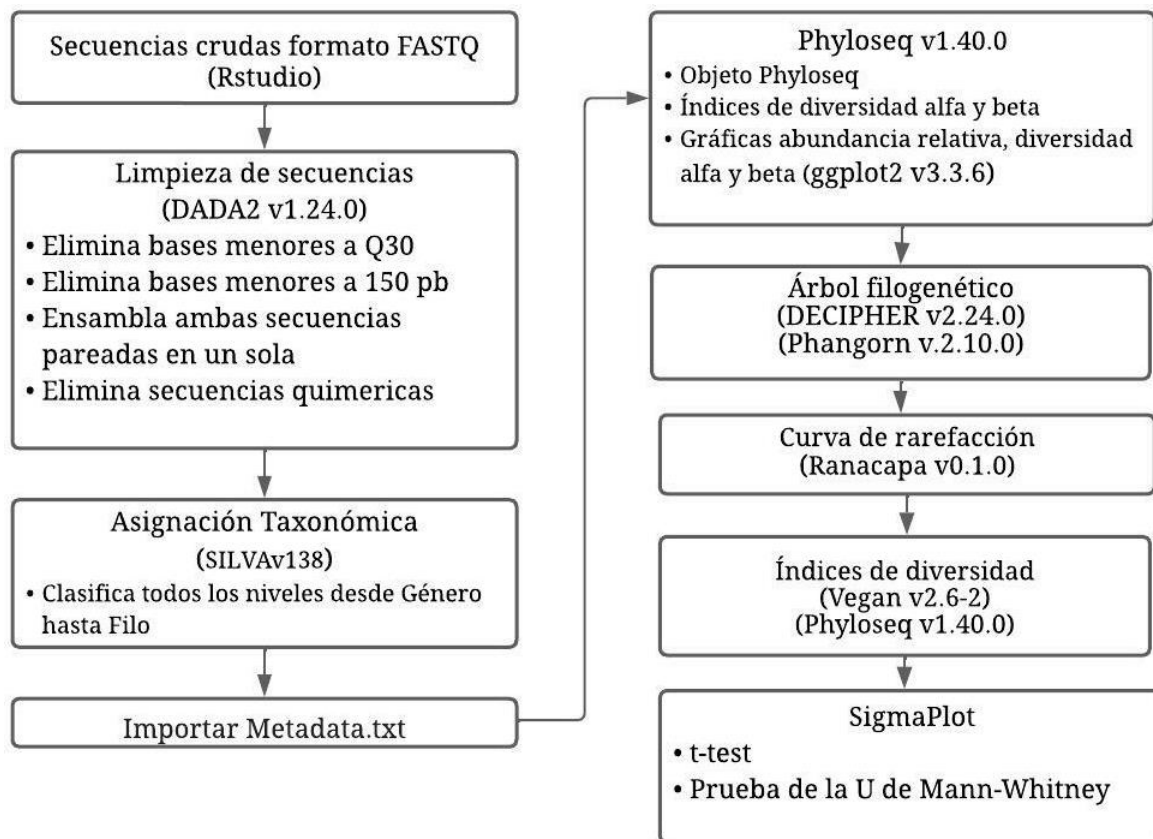


Figura 7. Diagrama de flujo de análisis bioinformático y estadístico de la secuenciación del gen ARNr 16S región V3.

Para determinar diferencias estadísticas en la comparación de los métodos de secuenciación se realizó un análisis de alfa diversidad de Shannon y Chao 1. Estos valores fueron evaluados con ANOVA de una vía ($p < 0.05$) por medio de sigmaPlot. La generación de graficas se genero por medio del software PAST4 v.4.11.

6.7 Análisis Bioinformático y Estadístico de la Secuenciación Metagenómica (Shotgun)

Limpieza de secuencias:

La secuenciación metagenómica también generó secuencias pareadas para cada muestra (total 28 archivos), correspondiendo a las secuencias Forward y Reverse. Para analizar la calidad de ambos archivos se utilizó el programa FastQC v0.11.5 (Andrews, 2010) y por medio de la terminal linux

se utilizó el script **fastx_trimmer** para eliminar secuencias con una calidad Phred inferior a Q20, además de eliminar las secuencias cortas y adaptadores. Los archivos con terminación R1 y R2 se convirtieron a formato FASTA por medio del script **seqtk** y posteriormente se concatenaron por medio del comando **cat**.

Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica se realizó en el servidor Biobacter del CIAD Unidad Mazatlán, por medio del clasificador **kraken2 v 0.1.0** (Wood & Langmead, 2019), las secuencias FASTQ fueron comparadas por medio de la base de datos Standard, la cual utiliza información taxonómica de NCBI, así como los genomas completos de RefSeq para los dominios bacteria, arquea y virus, junto con el genoma humano y posteriormente se descartaron las lecturas que correspondían al genoma humano.

Análisis taxonómico

Los resultados obtenidos del clasificador Kraken2 fueron evaluados en el lenguaje R implementando RStudio, la abundancia relativa fue generada con las 20 familias más abundantes utilizando el paquete Phyloseq v1.40.0. Se realizó un análisis de rarefacción por medio del paquete ampvis2 v2.7.31 (Albertsen, 2015).

La diversidad alfa se evaluó por medio de los índices Chao1 y Shannon-Wiener utilizando el paquete Vegan v2.6-2 (Oksanen, *et al.*, 2019) de Rstudio. Las graficas de abundancia relativa, diversidad alfa y beta fueron generadas por medio de los paquetes ggplot2 v3.3.6 (Wickham, 2016) y ampvis2 v2.7.31 (Albertsen, 2015).

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas en la diversidad entre las pacientes (DMG vs grupo control), los valores obtenidos con los índices de Shannon-Wiener y Chao1 fueron evaluados con una ANOVA de una vía ($p < 0.05$), y para determinar diferencias significativas de la abundancia de las lecturas se realizó la prueba t de Student (t-test) ($p < 0.05$) utilizando los softwares SigmaPlot y Rstudio. Para determinar diferencias significativas en la diversidad beta se realizó una PERMANOVA ($p < 0.05$) con 999 permutaciones para pruebas de significancia utilizando la función adonis implementada en el paquete Vegan de R.

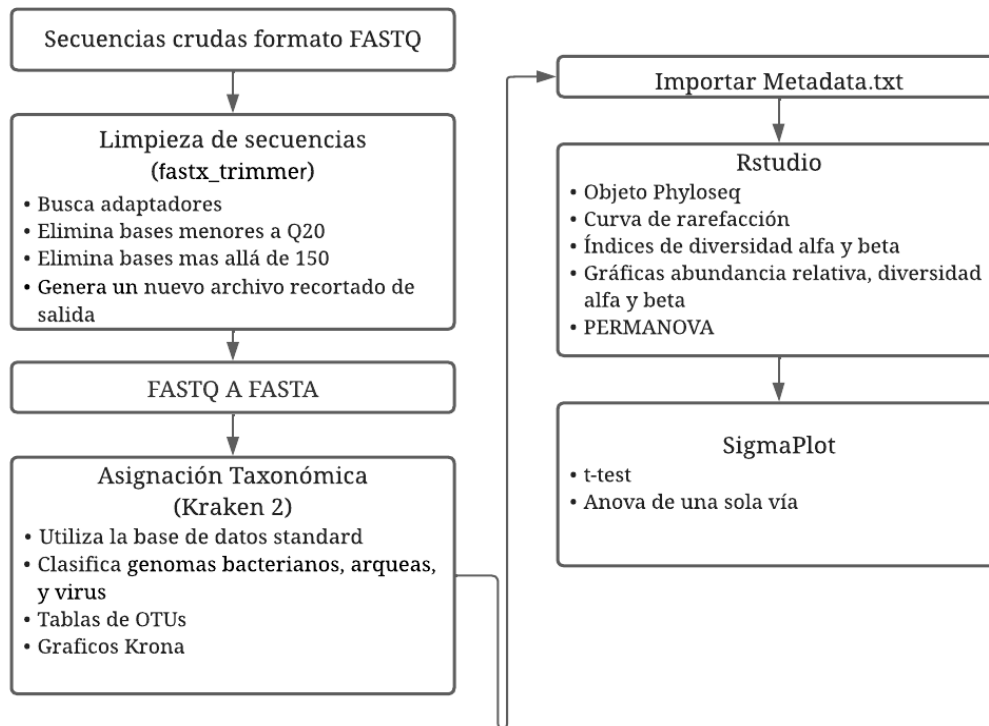


Figura 8. Diagrama de flujo de análisis bioinformático y estadístico de la secuenciación metagenómica para la clasificación taxonómica.

6.8 Clasificación Funcional

Se realizó una limpieza de secuencias por medio del script `fastx_trimmer` y posteriormente se agruparon las muestras en contigs para realizar el ensamble por medio del script `megahit_assembler.v0.0.1.sh` (Li *et al.*, 2015), en el servidor Biobacter del CIAD Unidad Mazatlán, el script a su vez limpió las secuencias con ambigüedades y los headers.

Una vez terminado el ensamble, se utilizó el script `metagenomic_workflow.v0.4.1.sh` (Bioinformatica microbiana, 2022) el cual simplifica el mapeo de las secuencias a los contigs, crea una base de datos de los contigs y asigna una taxonomía a cada gen para obtener una gráfica interactiva de Anvio lista para analizar. Para la visualización se utilizó el programa Anvio7, el cual se analizó desde la terminal Linux por medio de `conda-7`.

Se utilizó la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) para visualizar genes de resistencia y rutas metabólicas. Una vez identificados se agruparon en bins de acuerdo al mecanismo seleccionado y se observó la abundancia relativa en la muestra.

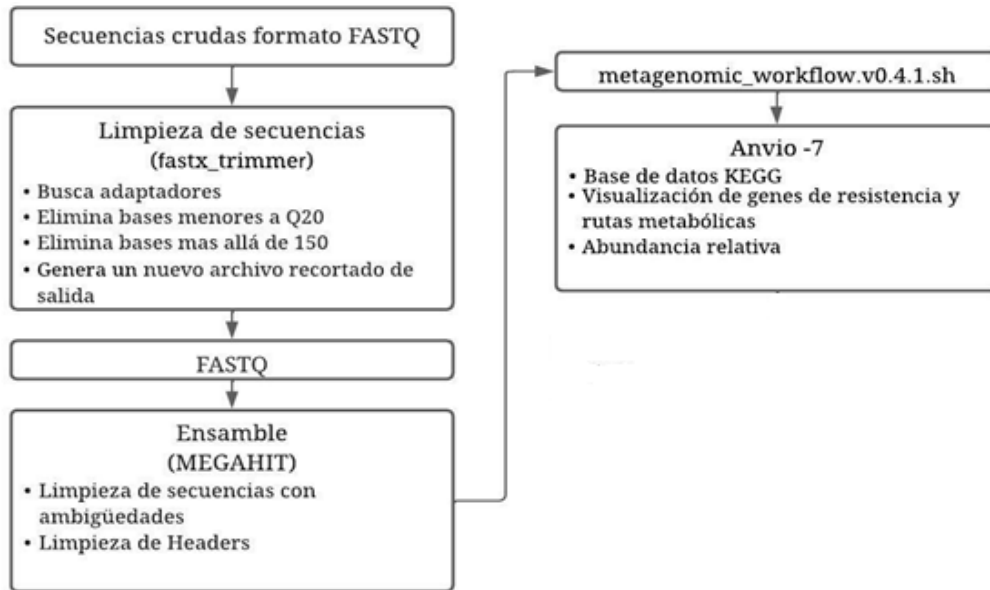


Figura 9. Diagrama de flujo de análisis bioinformático y estadístico de la secuenciación metagenómica para la clasificación funcional.

7. RESULTADOS

La secuenciación del microbioma vaginal se realizó en 14 mujeres embarazadas (9 pacientes DMG y 5 grupo control), 13 de las cuales eran de nacionalidad mexicana y una de nacionalidad cubana. El 88.8% de las pacientes con diabetes mellitus gestacional presentaban antecedentes familiares de diabetes, mientras que el 40% de las pacientes control presentaron ($P = 0.095$) (Cuadro 9).

El análisis entre el grupo control y DMG no presentaron diferencias estadísticas, solamente se determinaron diferencias de acuerdo a la curva de tolerancia a la glucosa ($P < 0.05$). Aunque no se encontraron diferencias significativas, el grupo con diabetes mellitus gestacional presentó mayor peso corporal en relación al grupo control.

El factor de edad no presentó diferencias significativas, las pacientes del grupo con diabetes mellitus gestacional se caracterizaron por tener mayor edad que el grupo control. Las pacientes con diabetes mellitus gestacional también presentan un índice de masa corporal más alto que el grupo control aunque no mostró diferencias significativas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Características clínicas de las pacientes. Se realizó un test exacto de Fisher para la validación estadística de las variables categóricas mientras que se realizó una prueba t de student (t-test) para validación de las variables numéricas. *curva de tolerancia oral a la glucosa. ** Índice de masa corporal.

| Características de las pacientes | Grupo DMG n=9 | Grupo Control n=5 | P-value |
|----------------------------------|------------------|-------------------|--------------|
| Edad | 34.222 ± 4.177 | 31.8 ± 4.087 | (P = 0.316) |
| Peso | 87.244 ± 22.499 | 71.82 ± 14.985 | (P = 0.198) |
| Altura | 160.778 ± 8.273 | 159.8 ± 7.950 | (P = 0.834) |
| Presentó Covid-19 | 4 (44.4%) | 1 (20%) | (P = 0.580) |
| CTGO* (mg/dL) | 106 ± 8.948 | 83.64 ± 5.508 | (P = <0.001) |
| CTGO 1hr (mg/dL) | 213.811 ± 46.602 | 129.84 ± 28.132 | (P = 0.003) |
| CTGO 2hrs (mg/dL) | 197.7 ± 58.715 | 120.02 ± 11.888 | (P = 0.014) |
| Antecedentes | 8 (88.8%) | 2 (40%) | (P = 0.095) |
| IMC** | 33.307 ± 5.186 | 28.22 ± 6.665 | (P = 0.137) |

Durante el embarazo 5 pacientes (1 del grupo control y 4 con DMG) padecieron COVID-19 (IgG positivo) sin complicaciones aparentes. De acuerdo a Celik y colaboradores (2022), la composición de la microbiota vaginal se ve afectada desfavorablemente por la enfermedad de COVID-19. La composición de la microbiota vaginal en el contexto de COVID-19 se puede observar en el Anexo 1.

En el grupo de diabetes mellitus gestacional, 6 pacientes presentaron obesidad, mientras que las 3 restantes presentaron sobrepeso. La obesidad ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) representa un factor de riesgo importante para la DMG debido a que las mujeres obesas tienen aproximadamente un 40% más de resistencia a la insulina en comparación con las mujeres de peso normal (Yong *et al.*, 2020; Rahnemaei *et al.*, 2022). En el grupo control solo una paciente tuvo un IMC normal, mientras que 3 pacientes presentaron sobrepeso y una paciente obesidad (Cuadro 10).

7.1 Secuenciación V3 del Gen ARNr 16S

Las 14 muestras empleadas en la secuenciación de la región V3 del gen ARNr 16S generaron 869,122 (~150 pb) secuencias. Las secuencias libres de quimeras correspondieron al 84% de las secuencias obtenidas. El promedio de las longitudes de las secuencias tipo de cada ASV detectado fue de 189 pb libres de quimeras. El análisis implementado con DADA2 generó 297 ASVs (Cuadro 10).

Cuadro 10. Índices de masa corporal y lecturas totales después de los procesos de limpieza y eliminación de chimeras para cada muestra.

| Código | IMC | Clasificación | Lecturas |
|--------|-------|---------------|----------|
| DMG016 | 32.81 | Obesidad | 43,447 |
| DMG022 | 26.56 | Sobrepeso | 78,179 |
| DMG030 | 43.93 | Obesidad | 71,465 |
| DMG051 | 29.42 | Sobrepeso | 52,102 |
| DMG052 | 32.89 | Obesidad | 69,010 |
| DMG053 | 32.67 | Obesidad | 48,647 |
| DMG069 | 29.18 | Sobrepeso | 42,738 |
| DMG073 | 34.19 | Obesidad | 2,648 |

| | | | |
|--------|-------|-----------|--------|
| DMG074 | 38.11 | Obesidad | 27,670 |
| CTR023 | 28.34 | Sobrepeso | 64,717 |
| CTR062 | 38.89 | Obesidad | 49,540 |
| CTR065 | 20.72 | Normal | 54,759 |
| CTR070 | 27.62 | Sobrepeso | 36,016 |
| CTR071 | 25.53 | Sobrepeso | 42,231 |

7.1.1 Análisis de la Representatividad de Secuenciación

Para evaluar las comunidades bacterianas que han sido muestreadas de forma desigual y determinar la eficiencia del muestreo, se realizó una curva de rarefacción (relación del esfuerzo de secuenciación con el número estimado de especies). El análisis de rarefacción mostró que la mayoría de las muestras alcanzaron la asíntota a ~12,000 secuencias (Figura 10), lo que indica que la profundidad de secuenciación fue suficiente para capturar la diversidad microbiana. La muestra DMG073 presentó pocas lecturas sin embargo, alcanzó la asíntota por lo que no se esperaba encontrar ASV adicionales al aumentar la profundidad de secuenciación.

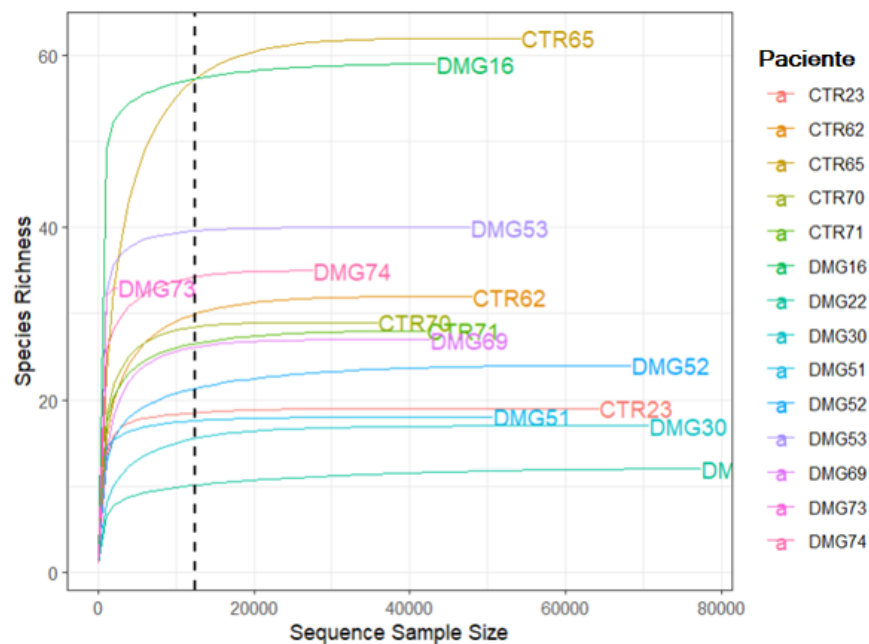


Figura 10. Curva de rarefacción de la riqueza de especies en cada muestra. Se puede observar que después de las doce mil secuencias se alcanzó la asíntota.

7.1.2 Composición Taxonómica de la Microbiota: Phyla

Las secuencias se clasificaron en un total de 10 filos por cada muestra (Figura 11), el 88.55% de los ASVs fueron asignados a nivel Phyla y los tres principales taxones en el grupo control fueron *Firmicutes* (76.05%), *Actinobacteriota* (23.66%) y *Proteobacteria* (0.16%), mientras que en el grupo DMG los phyla de mayor abundancia relativa también fueron *Firmicutes* (78.76%), seguido de *Actinobacteriota* (16.80%) y por último *Proteobacteria* (2.75%), (Cuadro 11).

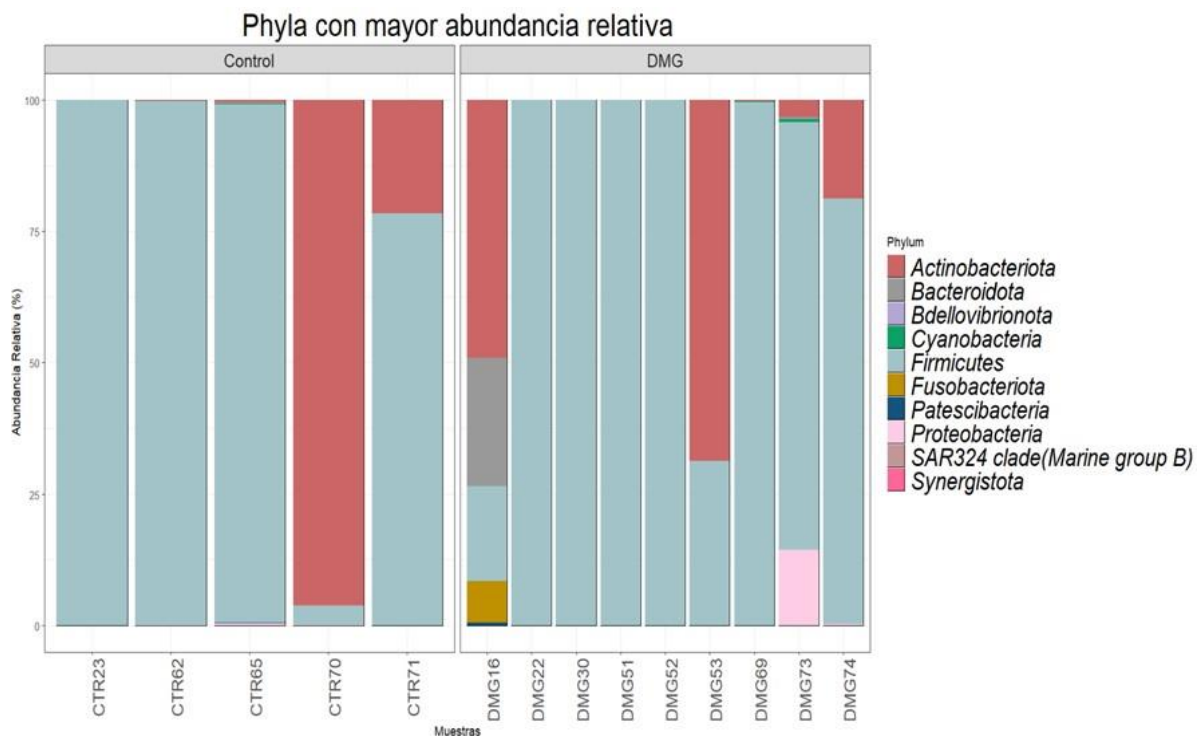


Figura 11. Composición taxonómica, los colores representan los 10 phyla con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje de las x.

El phylum *Firmicutes* se detectó con mayor abundancia en todas las muestras, sin embargo en el grupo control no dominaba en una paciente CTR70 (3.71%), siendo *Actinobacteriota* el phylum con mayor abundancia relativa (96.15%). En un microbioma disbiótico existe una diversidad de bacterias que se caracterizan por el phylum *Actinobacteriota*, esto incluye las especies *G. vaginalis* y *A. vaginae* (Lewis *et al.*, 2016). Al comparar los 10 phyla identificados en el ecosistema vaginal,

en el grupo con DMG, *Firmicutes* no dominaba en dos pacientes DMG16 (18.53%) y DMG053 (20.16%), destacando *Actinobacteriota* como el phylum de mayor abundancia relativa en ambas pacientes.

Cuadro 11. Abundancia relativa de los filios más abundantes

| Phyla | DMG | Control |
|-------------------------------------|------------|----------------|
| <i>Firmicutes</i> | 78.76% | 76.06% |
| <i>Actinobacteriota</i> | 16.80% | 23.66% |
| <i>Bacteroidota</i> | 2.75% | 0.08% |
| <i>Fusobacteriota</i> | 0.90% | 0% |
| <i>Proteobacteria</i> | 0.65% | 0.16% |
| <i>Patescibacteria</i> | 0.068% | 0.005% |
| <i>Cyanobacteria</i> | 0.05% | 0.005% |
| <i>Synergistota</i> | 0% | 0.002% |
| <i>Bdellovibrionota</i> | 0% | 0.001% |
| <i>SAR324 clade(Grupo marino B)</i> | 0% | 0.001% |

7.1.3 Composición Taxonómica de la Microbiota: Familia

Las Familias más abundantes en el grupo control fueron *Lactobacillaceae* (75.85%), *Atopobiaceae* (16.95%) y *Bifidobacteriaceae* (6.64%). En el grupo con DMG fueron *Lactobacillaceae* (66.88%), *Bifidobacteriaceae* (14.03%) y *Enterococcaceae* (10.15%). El 83% de los ASVs fueron asignados a nivel de familia.

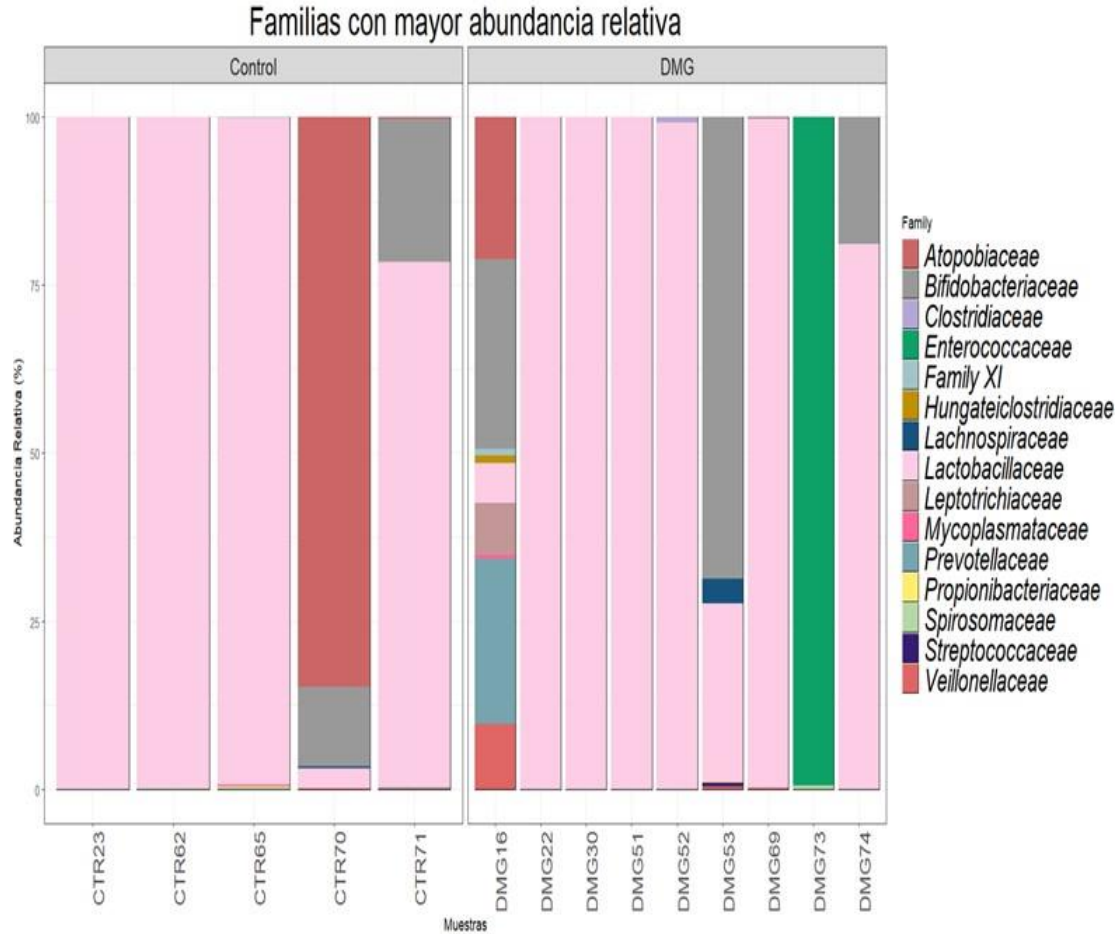


Figura 12. Composición taxonómica, los colores representan las 15 familias con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x.

Lactobacillaceae fue la familia dominante en la mayoría de las muestras del grupo control, excepto en la muestra CTR070 (Figura 12) debido a que mostraba una mayor abundancia de *Atopobiaceae* (84.44%). De acuerdo con el análisis de abundancia relativa, la familia más abundante fue *Lactobacillaceae*, sin embargo con diferente porcentaje (75.85% y 66.88%) en el grupo control y DMG respectivamente (Cuadro 12).

Cuadro 12. Abundancia relativa de las 15 familias más abundantes

| Familia | DMG | Control |
|-------------------------------|------------|----------------|
| <i>Lactobacillaceae</i> | 66.96% | 75.85% |
| <i>Atopobiaceae</i> | 2.31% | 16.95% |
| <i>Bifidobacteriaceae</i> | 14.04% | 6.64% |
| <i>Enterococcaceae</i> | 10.15% | 0% |
| <i>Prevotellaceae</i> | 2.71% | 0.01% |
| <i>Veillonellaceae</i> | 1.10% | 0.07% |
| <i>Mycoplasmataceae</i> | 0.04% | 0.03% |
| <i>Leptotrichiaceae</i> | 0.90% | 0% |
| <i>Spirosomaceae</i> | 0.05% | 0.06% |
| <i>Clostridiaceae</i> | 0.07% | 0% |
| <i>Eggerthellaceae</i> | 0.05% | 0% |
| <i>Lachnospiraceae</i> | 0.22% | 0.04% |
| <i>Family XI</i> | 0.17% | 0.007% |
| <i>Hungateiclostridiaceae</i> | 0.13% | 0.002% |
| <i>Streptococcaceae</i> | 0.03% | 0% |

Las muestras del grupo DMG que no presentaron una abundancia relativa mayor al 20% de *Lactobacillaceae* fueron las pacientes DMG16 (5.66%), DMG53 (17.57%) y DMG73 (0%), sin embargo, una paciente (DMG22) presentó 100% de abundancia relativa. Las pacientes con DMG que presentaron más del 90% de abundancia relativa de la familia *Lactobacillaceae* fueron DMG22 (100%), DMG30 (99.80%), DMG51 (99.95%), DMG53 (99.34%) y DMG69 (99.13%).

La familia *Enterococcaceae* mostró una abundancia de 9.16% en el grupo DMG mientras que en el grupo control no se encontró esta familia, sin embargo, este porcentaje se debe a que una sola paciente presentó un microbioma dominado por esta familia, la paciente DMG73 (82.51%).

7.1.4 Composición Taxonómica de la Microbiota: Género

Se detectaron 77 géneros. El 76% de los ASVs fueron asignados a nivel de género. Los géneros más abundantes en el grupo control fueron *Lactobacillus* (75.56%), *Atopobium* (9.93%) y *Gardnerella* (7.56%), en el grupo DMG, los géneros más abundantes fueron *Lactobacillus* (66.5924%), *Enterococcus* (10.188%) y

Bifidobacterium (8.8892%) (Figura 13).

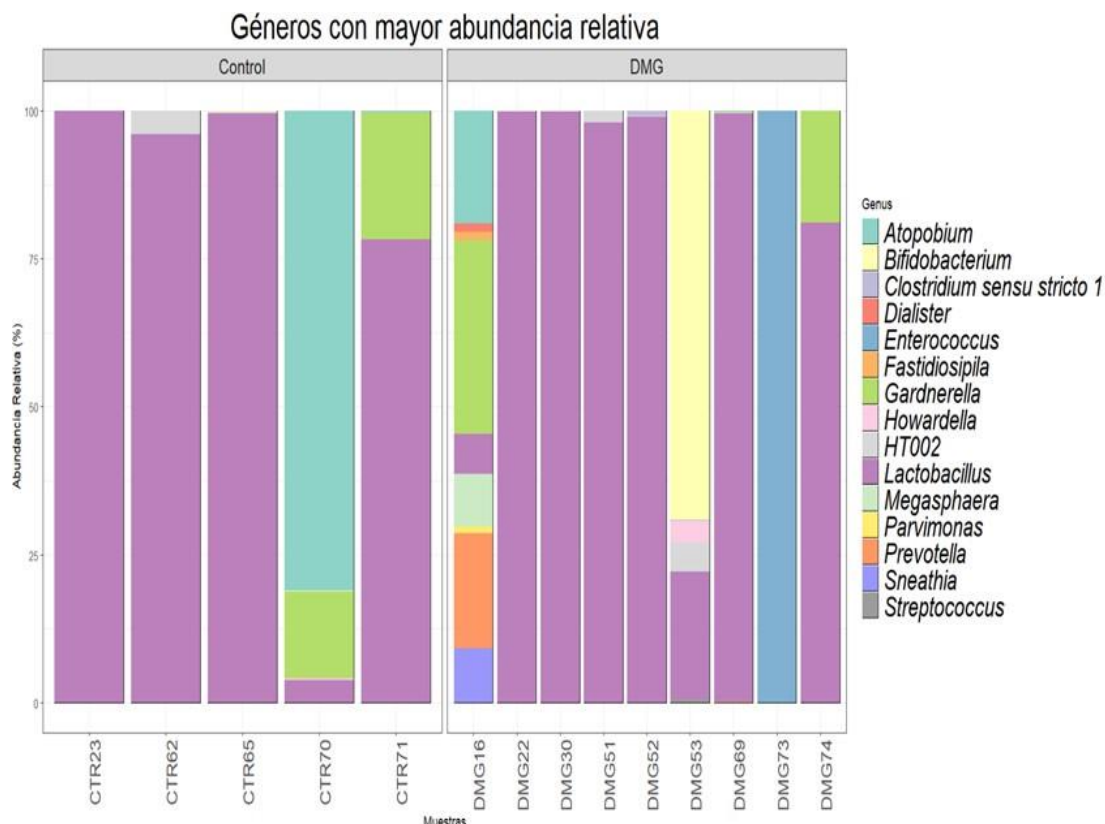


Figura 13. Composición taxonómica, los colores representan los 15 géneros con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x.

El género *Enterococcus* se ha asociado regularmente a infecciones urinarias, además, en mujeres embarazadas se asocia a riesgos de parto prematuro, corioamnionitis y funisitis del feto, o también en general a displasia cervical (Vazquez *et al.*, 2019), sin embargo el porcentaje alto de *Enterococcus* se debe a la paciente DMG73% al presentar una abundancia relativa de 91.69% (Cuadro 13).

El género *Lactobacillus* fue el más abundante en muestras del grupo control, en rangos de 96 a 99% en las pacientes CTR23 (99.93%), CTR62 (96.76%) y CTR65 (98.56%). La paciente CTR71 presentó una abundancia de *Lactobacillus* de 78.24% seguido de *Gardnerella* con 21.27% y la paciente CTR70 mostro una baja abundancia de *Lactobacillus* (4.29%).

Dentro del grupo con DMG, las pacientes DMG22 (99.83%), DMG30 (99.70%), DMG51 (98.59%), DMG52 (99.28%) y DMG69 (99.48%) también presentaron una abundancia relativa mayor al 90% del género *Lactobacillus*. Se encontraron diferencias en la composición bacteriana

y una mayor abundancia relativa en el grupo con diabetes mellitus gestacional a comparación del grupo control, en el cual se observan en mayor abundancia los géneros *Lactobacillus*, *Atopobium*, *Gardnerella* y *Coriobacteriaceae UCG-002* que constituyen un 98.7857% del microbioma total, sin embargo no fueron significativas (Figura 14).

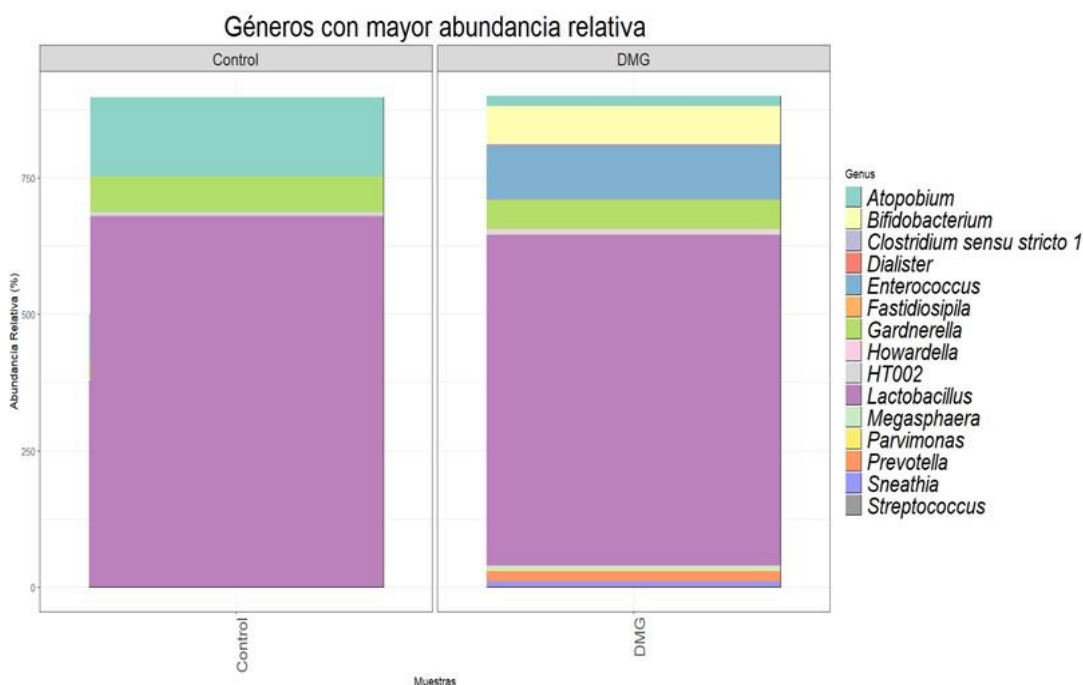


Figura 14. Gráfica de abundancia relativa que muestra las diferencias entre el grupo control y el grupo DMG con respecto a la categoría taxonómica de Género.

De acuerdo a la prueba estadística de t de Student que se realizó con las lecturas, no se determinaron diferencias significativas entre los géneros principales.

Cuadro 13. Prueba t de student para los 15 géneros con mayor abundancia de lecturas, para la normalización de los datos se realizó un test de Shapiro.

| Género (Valor de P) | DMG | Control | Valor de P |
|------------------------|--------|---------|------------|
| <i>Lactobacillus</i> | 66.59% | 75.56% | P = 0.920 |
| <i>Enterococcus</i> | 10.18% | 0% | P = 0.478 |
| <i>Gardnerella</i> | 5.75% | 7.56% | P = 0.769 |
| <i>Bifidobacterium</i> | 8.88% | 0.08% | P = 0.481 |
| <i>Atopobium</i> | 1.15% | 9.93% | P = 0.292 |

| | | | |
|------------------------------------|-------|--------|-----------|
| <i>Coriobacteriaceae UCG-002</i> | 0.61% | 5.72% | P = 0.284 |
| <i>Prevotella</i> | 2.20% | 0.005% | P = 0.477 |
| <i>Sneathia</i> | 1.07% | 0% | P = 0.475 |
| <i>Megasphaera</i> | 0.98% | 0% | P = 0.476 |
| <i>HT002</i> | 0.47% | 0.62% | P = 0.990 |
| <i>Howardella</i> | 0.22% | 0.06% | P = 0.516 |
| <i>Parvimonas</i> | 0.20% | 0% | P = 0.478 |
| <i>Dialister</i> | 0.16% | 0.007% | P = 0.464 |
| <i>Fastidiosipila</i> | 0.14% | 0% | P = 0.472 |
| <i>Clostridium sensu stricto 1</i> | 0.07% | 0% | P = 0.462 |

De acuerdo con el análisis de abundancia relativa se puede observar que dentro de los 15 géneros más abundantes entre los dos grupos, *Lactobacillus* presenta mayor abundancia sin embargo difieren en porcentaje (75.56% y 66.59%) entre el grupo control y DMG respectivamente). Es importante mencionar que *Sneathia* y *Megasphaera* son géneros característicos de la VB y no están presentes en el grupo control.

Por último, aunque no se observaron diferencias significativas, destaca una mayor abundancia de géneros anaeróbicos (*Sneathia*, *Megasphaera* y *Parvimonas*) en pacientes con DMG.

7.1.5 Análisis de Alfa Diversidad

Los índices de diversidad de Chao 1 mostraron mayor diversidad microbiana vaginal en el grupo DMG en comparación con el grupo control, sin embargo no presentaron diferencias significativas (Chao1, ANOVA de una sola vía, P = 0.491).

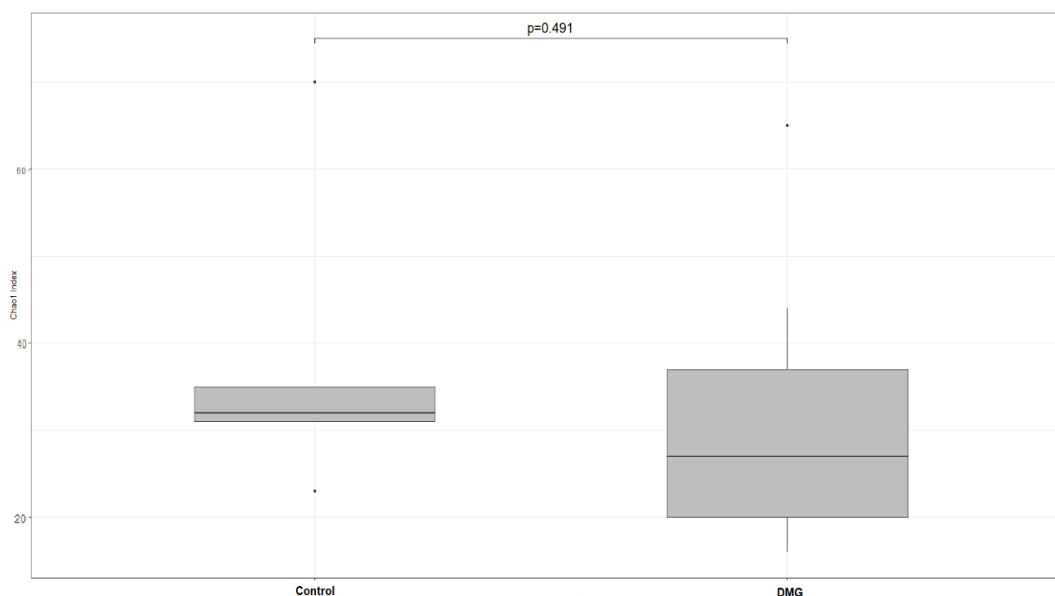


Figura 15. Boxplot de los valores de los índices de riqueza Chao 1. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad y muestran la mediana de cada grupo, la línea superior indica los resultados de la ANOVA de una sola vía.

Este índice se basa en el concepto de que los taxones raros aportan la mayor parte de la información sobre el número de taxones faltantes. Este índice otorga más peso a los taxones de baja abundancia (Chao, 1984).

Cuadro 14. Resultados del ANOVA de una sola vía (media \pm desviación estándar). Se realizó una prueba Post-hoc de Tuckey.

| Chao 1 (P =0.491) | |
|--------------------------|---------------------------------------|
| Control | 32.000 \pm 18.322 |
| DMG | 27.000 \pm 15.476 |

El índice de diversidad de Shannon-Wiener no mostró diferencias significativas (ANOVA, P = 0.24), sin embargo, de acuerdo a la representación grafica boxplot, se puede observar que el grupo con diabetes gestacional presenta mayor diversidad bacteriana en comparación del grupo control.

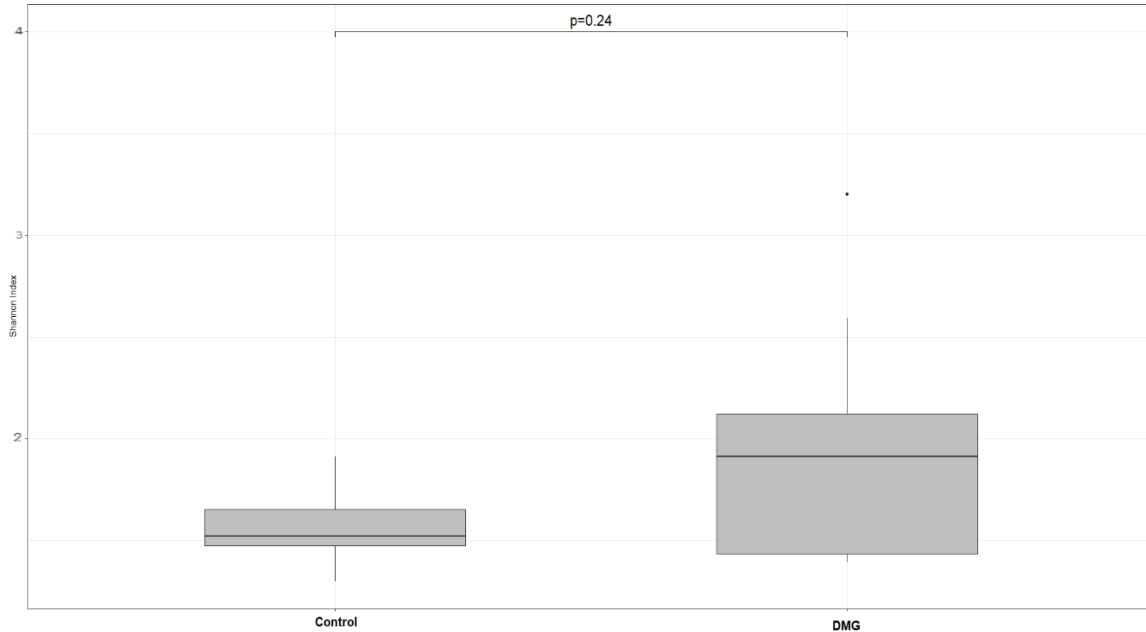


Figura 16. Boxtplot de los valores de los índices de riqueza de Shannon-Wiener. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad y muestran la mediana de cada grupo, la línea superior indica los resultados de la ANOVA de una sola vía.

Cuadro 15. Resultados del ANOVA de una sola vía (media \pm desviación estándar). Se realizó una prueba Post-hoc de Tuckey.

| Shannon-Wiener (P =0.24) | |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| Control | 1.523 \pm 0.228 |
| DMG | 1.915 \pm 0.6275 |

7.1.6 Análisis de Beta Diversidad

El análisis de PCoA-UniFrac ponderado, el cual utiliza información filogenética y de abundancia relativa, no reveló una separación clara de las comunidades microbianas del microbioma vaginal. Esto se confirmó estadísticamente con la prueba no paramétrica de adonis (UniFrac Ponderado, PERMANOVA, **P= 0.935**).

De acuerdo al análisis de coordenadas principales ponderado de la distancia UniFrac, podemos observar que los dos primeros ejes constituyen un 82.1% de la varianza, representados

individualmente entre paréntesis junto a PCoA 1 y PCoa 2.

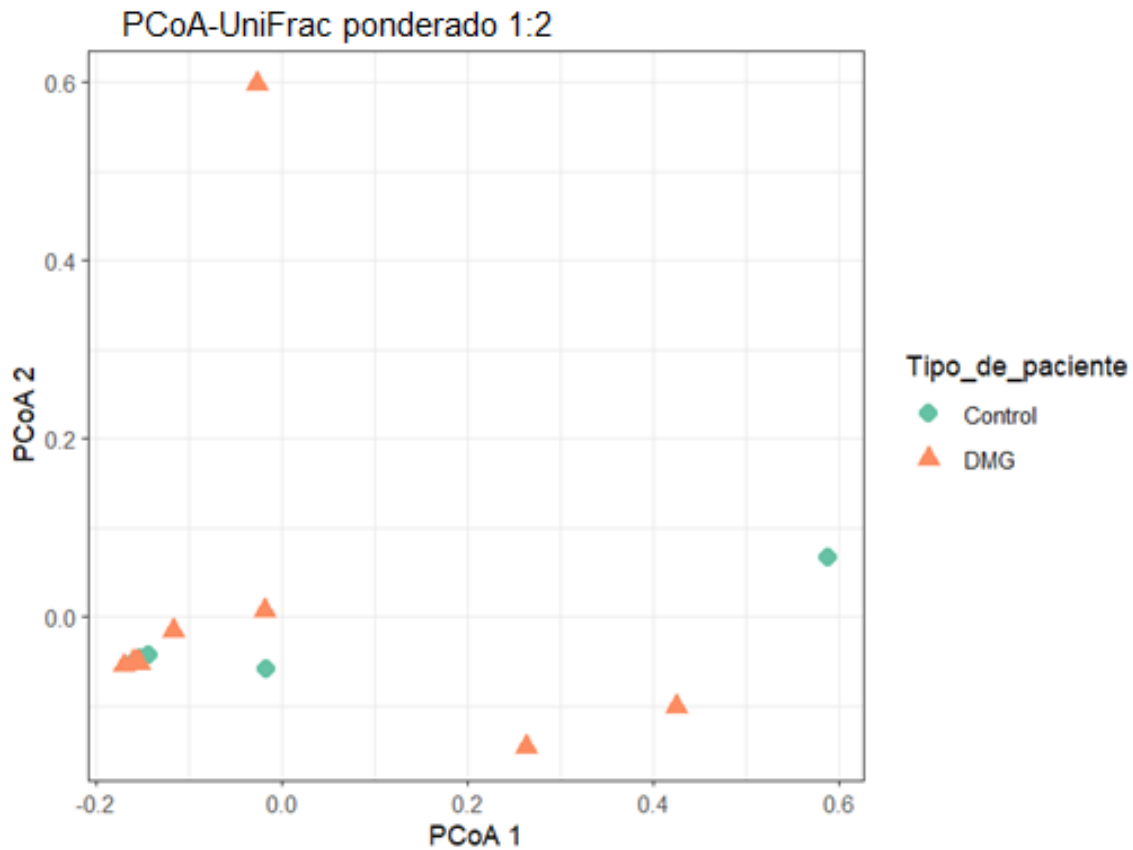


Figura 17. Diagrama PCoA-UniFrac ponderado, que muestra la separación de las muestras control (naranja) y DMG (verde). La figura muestra los ejes PCoA 1 (52.3%) y PCoA 2 (29.8%), mientras que los ejes 1:3 y 2:3 se encuentran en el Anexo 4.

Al realizar el análisis de coordenadas principales no ponderado (PCoA-UniFrac no ponderado) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y DMG. Esto se confirmó estadísticamente con la prueba no paramétrica de adonis (PCoA-UniFrac no ponderado, PERMANOVA, $P= 0.961$).

Se puede observar que los dos primeros ejes constituyen un 73.1% de la varianza, representados individualmente entre paréntesis junto a PCoa 1 y PCoa 2.

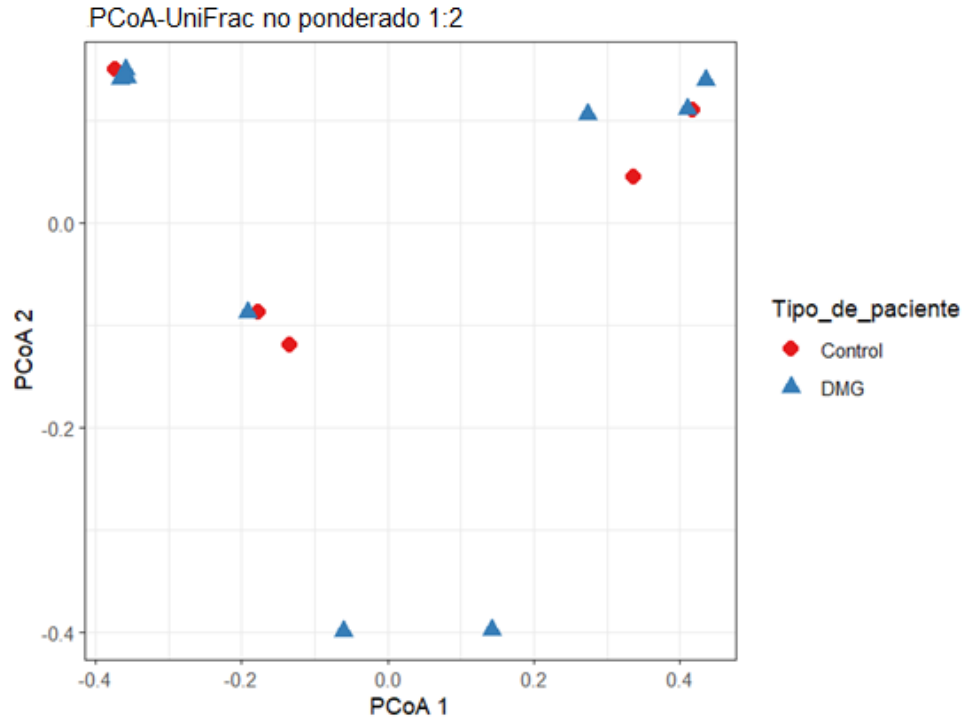


Figura 18. Diagrama PCoA-UniFrac no ponderado, que muestra la separación de las muestras control (rojo) y DMG (azul). La figura muestra los ejes PCoA 1 (56.4%) y PCoA 2 (16.7%), mientras que los ejes 1:3 y 2:3 se encuentran en el Anexo 4.

7.2. Resultados de la Secuenciación Metagenómica

La secuenciación del microbioma vaginal por medio de la secuenciación shotgun, dio como resultado un promedio de de 1'183,289 secuencias. Un total de 14 muestras fueron clasificadas por medio de Kraken utilizando la base de datos standard.

Cuadro 16. Cantidad de secuencias metagenómicas por muestra.

| Muestras | Secuencias |
|----------|------------|
| CTR23 | 1,466,804 |
| CTR62 | 1,252,512 |
| CTR65 | 932,000 |
| CTR70 | 1,242,344 |
| CTR71 | 587,042 |

| | |
|-------|-----------|
| DMG16 | 1,511,008 |
| DMG22 | 1,103,074 |
| DMG30 | 1,348,180 |
| DMG51 | 985,778 |
| DMG52 | 1,217,808 |
| DMG53 | 1,529,864 |
| DMG69 | 1,087,204 |
| DMG73 | 1,167,010 |
| DMG74 | 1,100,906 |

A diferencia de la secuenciación ARNr 16S, la secuenciación metagenómica analiza el genoma, lo que significa que también puede identificar genes de distintos tipos de microorganismos y sus funciones.

7.2.1 Análisis de la Representatividad de Secuenciación

El análisis de rarefacción mostró que las curvas para cada muestra no alcanzaron la asíntota. Aparentemente la muestra **DMG16** presenta una mayor riqueza de especies en comparación con las otras muestras.

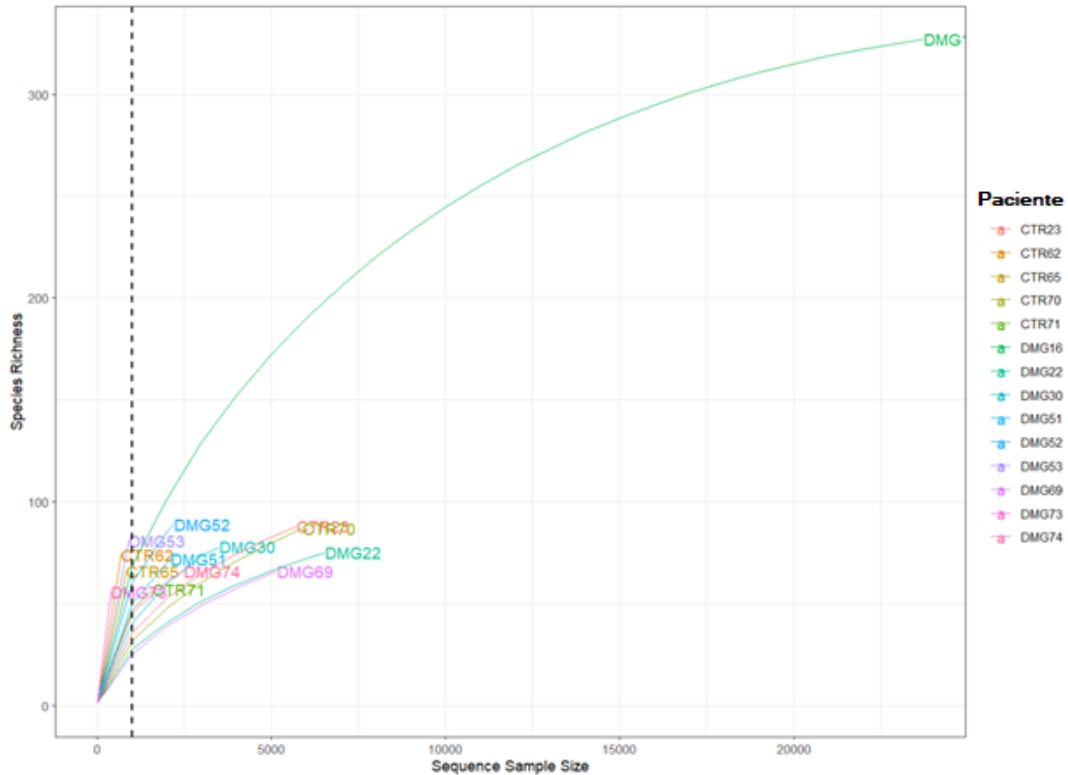


Figura 19. Curva de rarefacción de la riqueza de especies, cada curva representa un metagenoma individual. A medida que aumenta el número de secuencias de una muestra, aumenta el número de OTUs.

La metagenómica secuencia indiscriminadamente todo el material de ADN en una muestra y, por lo tanto, generalmente requiere mayor profundidad por muestra para encontrar identificadores taxonómicos únicos (Zaheer *et al.*, 2018).

7.2.2 Abundancia Relativa: Especie

A nivel de Especie, las especies con mayor abundancia relativa en el grupo control fueron *Lactobacillus crispatus* (32.55%), *Fannyhessea vaginae* (15.48%) y *Lactobacillus iners* (10.93%). Mientras que dentro del grupo con DMG las especies más abundantes fueron *Lactobacillus crispatus* (37.42%), *Lactobacillus jensenii* (7.01%) y *Bifidobacterium dentium* (6.83%) (Figura 20, Cuadro 20).

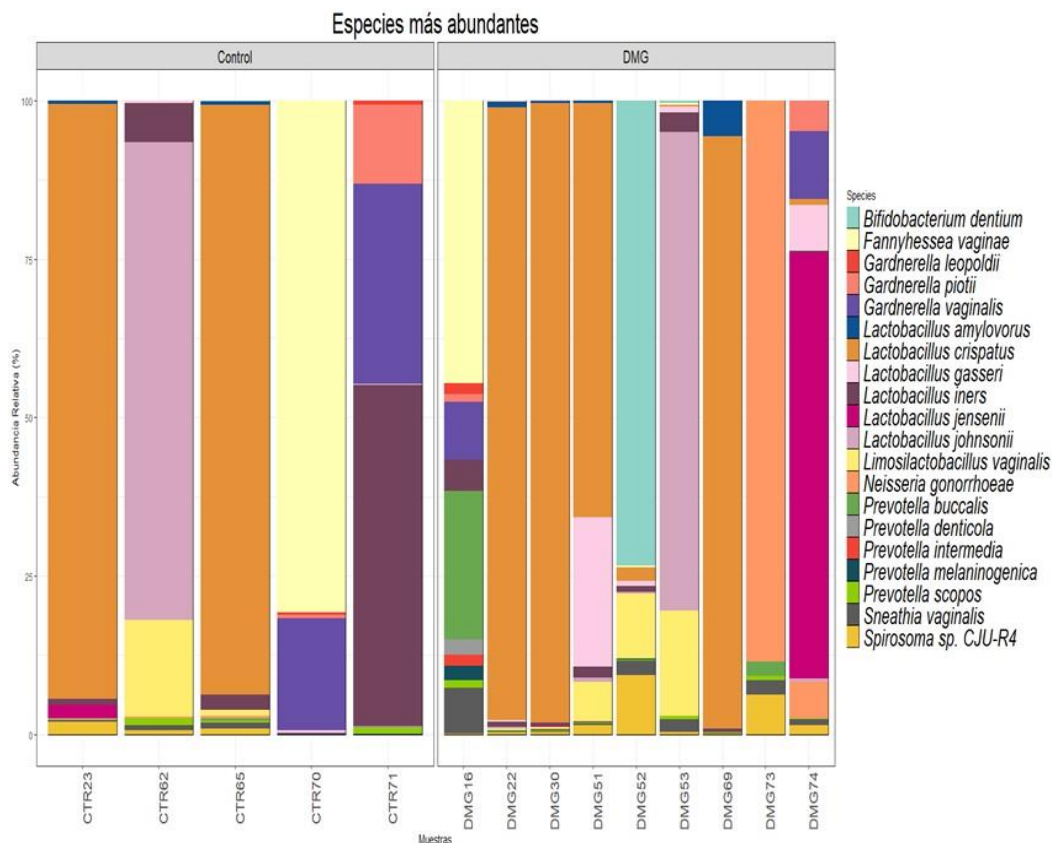


Figura 20. Composición taxonómica, los colores representan las 20 especies con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x.

Cuadro 17. Especies del género *Lactobacillus* que se encontraron en ambos grupos.

| Especie | Grupo Control | Especie | Grupo DMG |
|--------------------------------------|----------------------|------------------------------------|------------------|
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | 32.55% | <i>Lactobacillus crispatus</i> | 37.42% |
| <i>Lactobacillus iners</i> | 10.93% | <i>Lactobacillus jensenii</i> | 7.01% |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i> | 10.50% | <i>Lactobacillus johnsonii</i> | 5.98% |
| <i>Lactobacillus taiwanensis</i> | 1.04% | <i>Lactobacillus gasseri</i> | 3.26% |
| <i>Lactobacillus jensenii</i> | 0.40% | <i>Lactobacillus iners</i> | 1.21% |
| <i>Lactobacillus paragasseri</i> | 0.23% | <i>Lactobacillus amylovorus</i> | 0.78% |
| <i>Lactobacillus amylovorus</i> | 0.16% | <i>Lactobacillus paragasseri</i> | 0.65% |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | 0.15% | <i>Lactobacillus taiwanensis</i> | 0.40% |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 0.15% | <i>Lactobacillus helveticus</i> | 0.38% |
| <i>Lactobacillus intestinalis</i> | 0.13% | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | 0.11% |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | 0.10% | <i>Lactobacillus intestinalis</i> | 0.10% |
| <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> | 0.06% | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 0.08% |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | 0.03% | <i>Lactobacillus gallinarum</i> | 0.01% |
| <i>Lactobacillus ultunensis</i> | 0.01% | <i>Lactobacillus ultunensis</i> | 0.01% |
| <i>Lactobacillus amylolyticus</i> | 0.01% | <i>Lactobacillus acetotolerans</i> | 0.01% |

| | | | |
|------------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|
| <i>Lactobacillus panisapium</i> | 0.006% | <i>Lactobacillus amylolyticus</i> | 0.008% |
| <i>Lactobacillus acetotolerans</i> | 0.003% | <i>Lactobacillus sp. CBA3606</i> | 0.006% |
| <i>Lactobacillus gallinarum</i> | 0% | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> | 0.006% |
| <i>Lactobacillus sp. CBA3606</i> | 0% | <i>Lactobacillus panisapium</i> | 0.002% |

De acuerdo a la prueba estadística de t de Student que se realizó con las lecturas, no se determinaron diferencias significativas entre las especies más abundantes (Cuadro 21).

Cuadro 18. Prueba t de student para las 20 especies más abundantes, para la normalización de los datos se realizó un test de Shapiro.

| Especie | DMG | Control | Valor de P |
|--------------------------------------|------------|----------------|-------------------|
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | 37.42% | 32.55% | P = 0.634 |
| <i>Fannyhessea vaginae</i> | 4.46% | 15.48% | P = 0.634 |
| <i>Lactobacillus iners</i> | 1.21% | 10.93% | P = 0.634 |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i> | 5.98% | 10.50% | P = 0.854 |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> | 2.02% | 8.96% | P = 0.890 |
| <i>Gardnerella piotii</i> | 0.61% | 2.29% | P = 0.988 |
| <i>Limosilactobacillus vaginalis</i> | 2.90% | 2.26% | P = 0.338 |
| <i>Spirosoma sp. CJU-R4</i> | 1.57% | 0.60% | P = 0.725 |
| <i>Lactobacillus jensenii</i> | 7.01% | 0.40% | P = 0.538 |
| <i>Prevotella scopus</i> | 0.23% | 0.36% | P = 0.521 |
| <i>Sneathia vaginalis</i> | 1.34% | 0.35% | P = 0.464 |
| <i>Gardnerella leopoldii</i> | 0.18% | 0.20% | P = 0.544 |
| <i>Lactobacillus amylovorus</i> | 0.78% | 0.16% | P = 0.442 |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | 3.26% | 0.15% | P = 0.349 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 4.86% | 0.11% | P = 0.291 |
| <i>Prevotella denticola</i> | 0.22% | 0.06% | P = 0.488 |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 2.44% | 0.04% | P = 0.477 |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 0.18% | 0% | P = 0.477 |
| <i>Bifidobacterium dentium</i> | 6.83% | 0.02% | P = 0.478 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 0.28% | 0% | P = 0.460 |

7.2.3 Tipos de Estado Comunitario (CSTs)

El análisis taxonómico a nivel especie reveló siete tipos de estado comunitario que estaban presentes en todas la pacientes. Los taxones principales en las mujeres embarazadas se

representaron mediante un mapa de calor (Figura 24). Cuatro de estos CSTs presentaron una abundancia relativa alta de especies de *Lactobacillus*. De acuerdo con estudios previos, se nombraron de la siguiente manera: CST I dominado por *L. crispatus*, CST II dominado por *L. gasseri/L. jhonsonii*, CST III dominado por *L. iners* y CST V dominado por *L. jensenii*. Los CST I y IV fueron más comunes, sin embargo CST IV también conocido como microbioma vaginal similar a VB, se dividió en tres subtipos de acuerdo a los estudios de Molina y colaboradores en 2022, CST IV-A (abundancia de las especies *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* y *Prevotella* spp.), CST IV-C (no presenta especies de *Lactobacillus* y CST IV-D (presenta *Bifidobacterium dentium* y *Gardnerella vaginalis*).

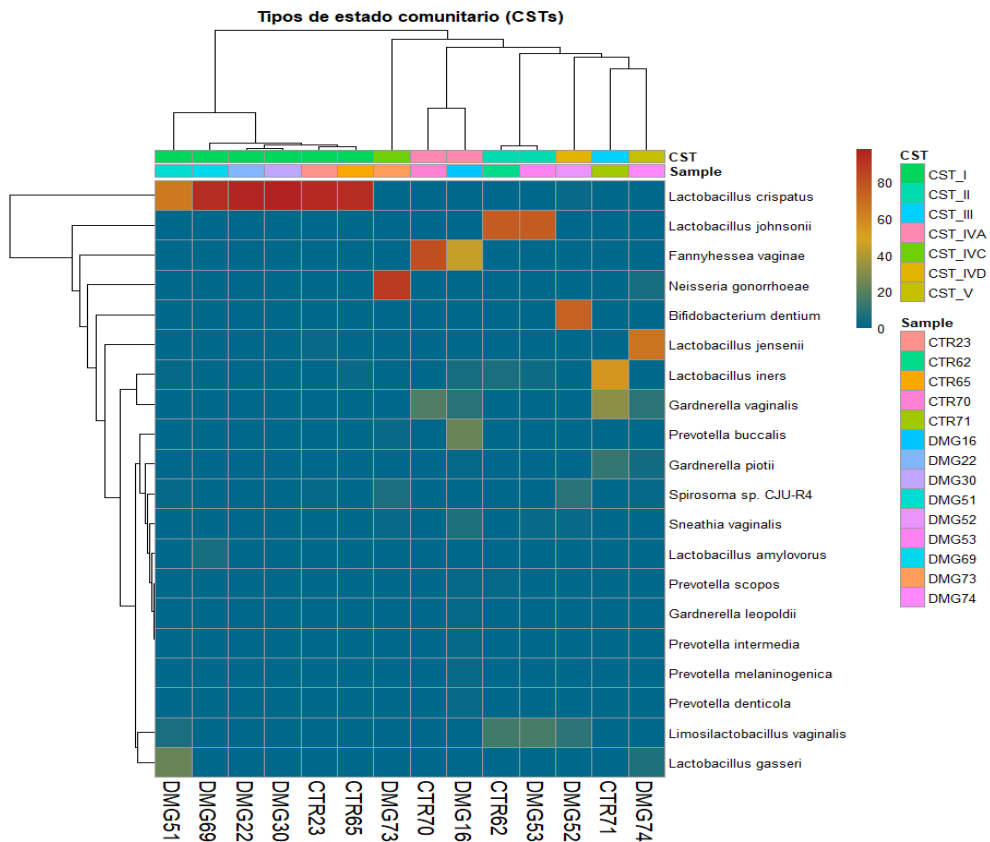


Figura 21. Mapa de calor de la composición de la microbiota cervicovaginal de las 20 especies más abundantes y agrupación de tipo de estado comunitario (CST).

7.2.4 Diversidad Alfa

Los índices de diversidad de Chao 1 no mostraron diferencias significativas (Chao1, ANOVA de una sola vía, $P = 0.652$) (Figura 22, Cuadro 19).

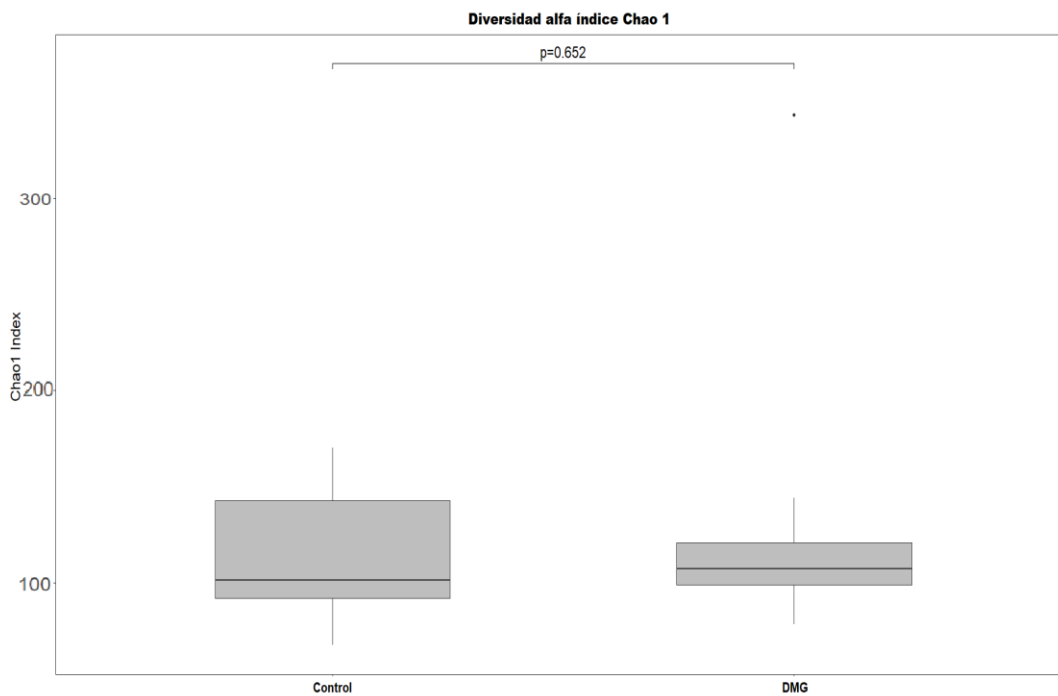


Figura 22. Boxplot de los valores de los índices de riqueza de Chao1. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad alfa y muestran la mediana de cada grupo. La línea inferior indica los resultados de la ANOVA de una sola vía.

Cuadro 19. Resultados del ANOVA de una sola vía (media \pm desviación estándar). Se realizó una prueba Post-hoc de Tuckey.

| Chao 1 (P=0.652) | |
|------------------|----------------------|
| Control | 114.645 \pm 41.131 |
| DMG | 132.807 \pm 81.043 |

El índice de diversidad de Shannon-Wiener es una medida de diversidad que combina la riqueza

de especies y sus abundancias relativas. Este índice tampoco mostró diferencias significativas (Shannon, ANOVA de una sola vía, $P = 0.775$) (Figura 23, Cuadro 20).

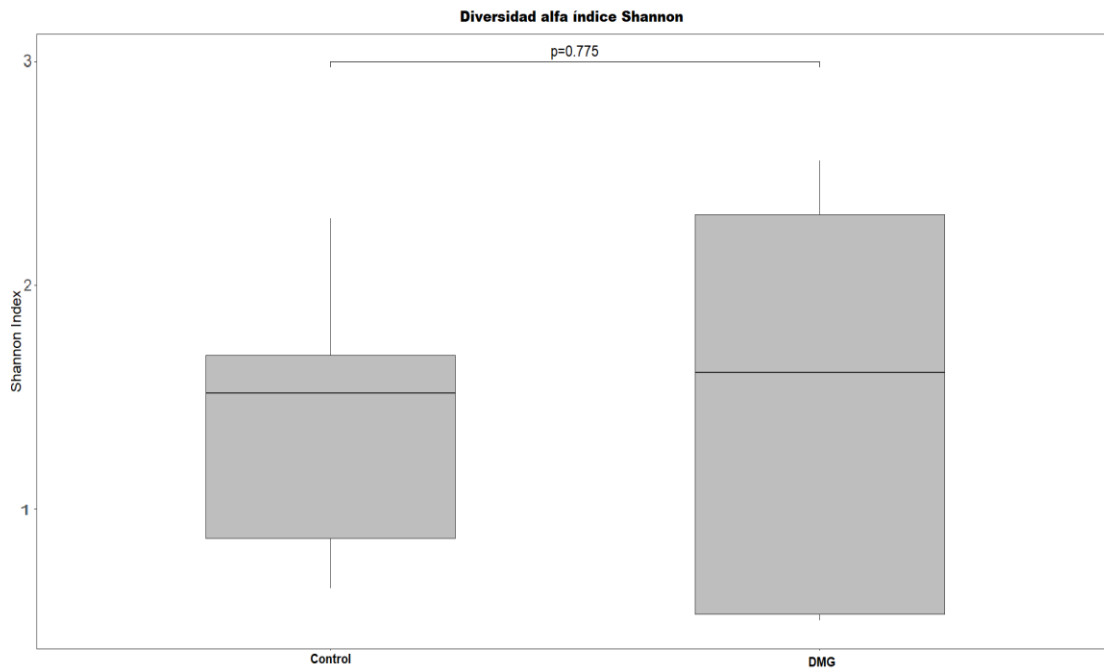


Figura 23. Boxtplot de los valores de los índices de Shannon. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad alfa y muestran la mediana de cada grupo. La línea inferior indica los resultados de la ANOVA de una sola vía.

El índice de Shannon indica el número total de taxones en la muestra y su porcentaje. Mayor sea la diversidad de la comunidad y a su vez más uniforme la distribución, mayor será el índice.

Cuadro 20. Resultados del ANOVA de una sola vía (media \pm desviación estándar). Se realizó una prueba Post-hoc de Tuckey.

| Shannon-Wiener (P=0.775) | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Control | 1.404 \pm 0.663 |
| DMG | 1.530 \pm 0.828 |

7.2.5 Diversidad Beta

El índice Bray Curtis se basa en datos de abundancia y mide la disimilitud de composición entre las comunidades microbianas. Al realizar el análisis de coordenadas principales no se determinó una disimilitud entre los grupos. Esto se confirmó estadísticamente con la prueba no paramétrica de adonis (Braycurtis, UniFrac, PERMANOVA, $P= 0.661$).

Se puede observar que los dos primeros ejes constituyen un 88.5% de la varianza, representados individualmente entre paréntesis junto a PCoA 1 y PCoA 2 (Figura 24).

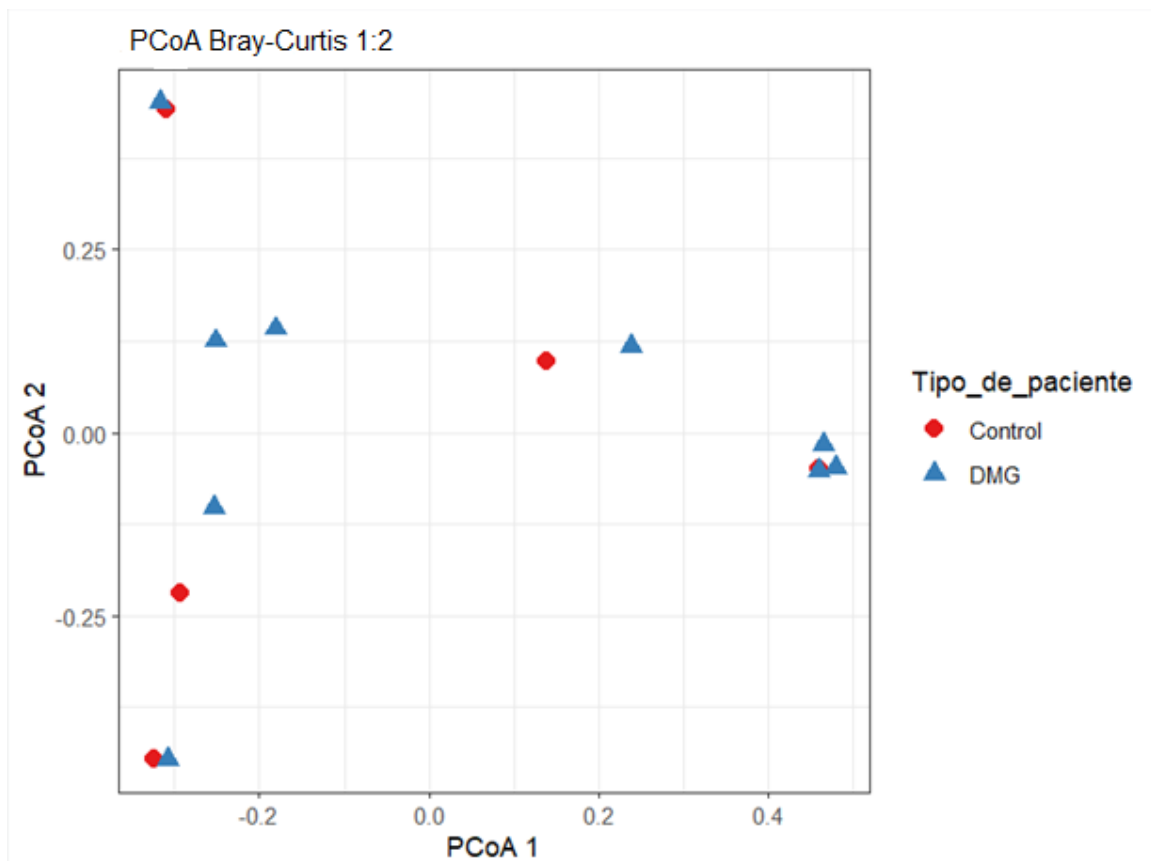


Figura 24. Diagrama de coordenadas principales Bray Curtis que muestra la separación de las muestras control (rojo) y DMG (azul).). La figura muestra los ejes PCoA 1 (30.7%) y PCoA 2 (17.9%), mientras que los ejes 1:3 y 2:3 se encuentran en el Anexo 5.

7.2.6 Comparacion de los Métodos de Secuenciacion

El índice Chao 1 mostró valores altos en la secuenciación shotgun en referencia a los resultados de la secuenciación del gen ARNr 16S (Anova de una sola vía, Control, $P = 0.015$; DMG, $P = 0.001$).

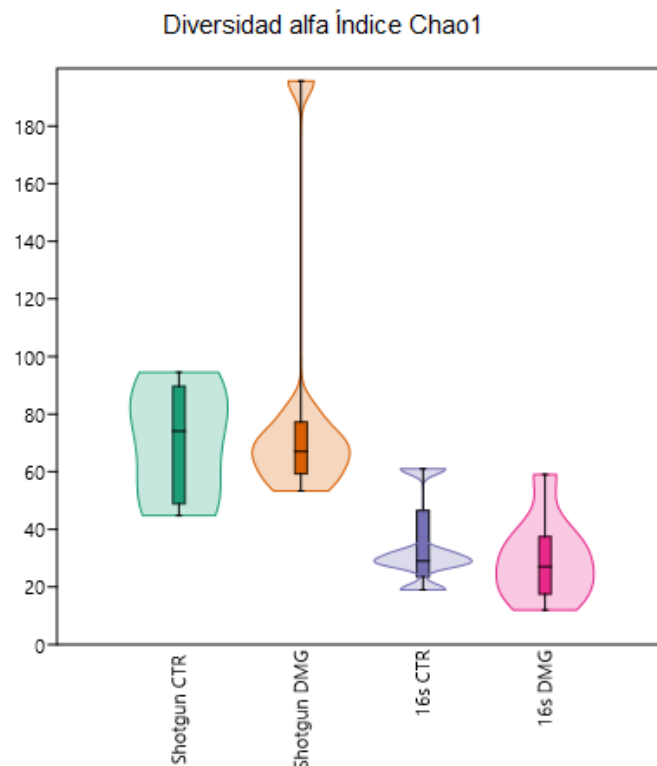


Figura 25. Boxtplot de los valores de los índices de riqueza de Chao1. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad alfa y muestran la mediana de cada grupo.

El índice de diversidad de Shannon-Wiener solo mostró diferencias significativas dentro del grupo DMG (ANOVA de una sola vía, $P = 0.031$).

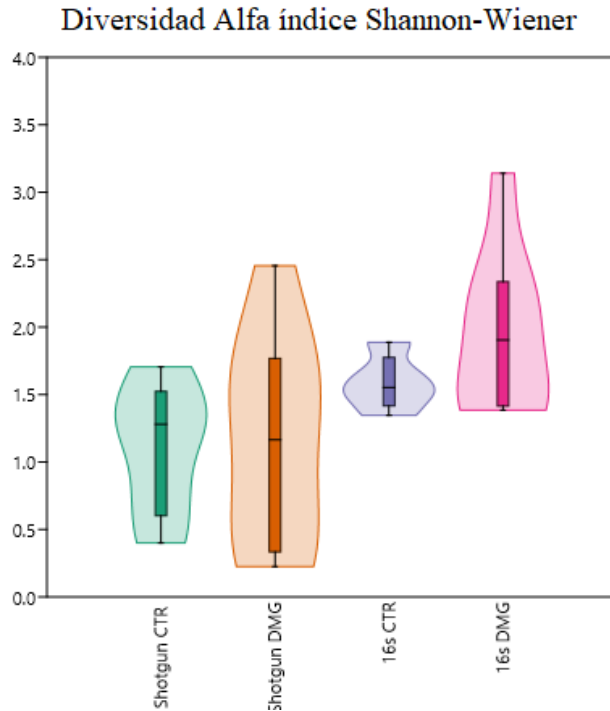


Figura 26. Boxtplot de los valores de los índices de Shannon. Los cuadros representan las distribuciones del índice de diversidad alfa y muestran la mediana de cada grupo.

La ANOVA de una vía mostró diferencias significativas en cuanto a los métodos de secuenciación a nivel de género ($P < 0.005$) (Cuadro 21). La secuenciación Shotgun identificó mayor riqueza (índice Chao 1) en el grupo control y DMG en comparación con el método de secuenciación ARNr 16S ($P = 0.015$, $P = 0.001$). Sin embargo el índice Shannon-Wiener mostró menor diversidad de géneros con respecto a la secuenciación Shotgun de las pacientes del grupo DMG ($P = 0.031$).

Cuadro 21. Resultados del ANOVA de una sola vía (media \pm desviación estándar). Se realizó una prueba Post-hoc de Tuckey.

| Secuenciación | Chao 1 (media \pm desviación estándar) | Valor de P | Shannon-Wiener (media \pm desviación estándar) | Valor de P |
|---------------|--|-------------|--|-------------|
| Shotgun CTR | 70.255 \pm 20.988 | $P = 0.015$ | 1.106 \pm 0.509 | $P = 0.085$ |
| ARNr 16S CTR | 33.80 \pm 15.959 | | 1.587 \pm 0.204 | |
| Shotgun DMG | 67.00 \pm 43.959 | $P = 0.001$ | 1.163 \pm 0.782 | $P = 0.031$ |
| ARNr 16S DMG | 27.00 \pm 14.352 | | 1.944 \pm 0.603 | |

7.3 Metagenómica Funcional

El análisis funcional se realizó con Anvio 7 y no se encontraron genes de resistencia antibiótica, solamente se identificaron un total de 53 funciones metabólicas en todas las muestras, esto se debe probablemente a la contaminación de ADN humano el cual mostraba un promedio de 1, 056,448.14 de lecturas por paciente (Figura 27, Cuadro 22).

Cuadro 22. Identificación de vías funcionales

| Kegg ID | Función |
|----------------|--|
| M00001 | Glucólisis (vía de Embden-Meyerhof), glucosa => piruvato |
| M00002 | Glucólisis, módulo central en el que intervienen compuestos de tres carbonos |
| M00003 | Gluconeogénesis, oxalacetato => fructosa-6P |
| M00009 | Ciclo del citrato (ciclo TCA, ciclo de Krebs) |
| M00011 | Ciclo del citrato, oxidación del segundo carbono, 2-oxoglutarato => oxaloacetato |
| M00005 | biosíntesis de PRPP, ribosa 5P => PRPP |
| M00308 | Vía semifosforilativa Entner-Doudoroff, gluconato => glicerato-3P |
| M00552 | Degradación del D-galactonato, vía De Ley-Doudoroff, D-galactonato => glicerato-3P |
| M00550 | Degradación del ascorbato, ascorbato => D-xilulosa-5P |
| M00854 | Biosíntesis del glucógeno, glucosa-1P => glucógeno/almidón |
| M00855 | Degradación del glucógeno, glucógeno => glucosa-6P |
| M00565 | Biosíntesis de la trehalosa, D-glucosa 1P => trehalosa |
| M00532 | Fotorespiración |
| M00165 | Ciclo reductor de la pentosa fosfato (ciclo de Calvin) |
| M00166 | Ciclo reductor de la pentosa fosfato, ribulosa-5P => gliceraldehído-3P |
| M00167 | Ciclo reductor de la pentosa fosfato, gliceraldehído-3P => ribulosa-5P |
| M00168 | CAM (metabolismo de ácidos crasuláceos) |
| M00172 | Ciclo del ácido dicarboxílico C4, NADP - tipo de enzima málica |
| M00171 | Ciclo del ácido dicarboxílico C4, tipo de enzima málica NAD |
| M00170 | Ciclo del ácido dicarboxílico C4, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa |
| M00173 | Ciclo reductor del citrato (ciclo Arnon-Buchanan) |
| M00374 | Ciclo del dicarboxilato-hidroxitirato |
| M00346 | Asimilación del formaldehído, vía de la serina |
| M00345 | Asimilación del formaldehído, vía de la ribulosa monofosfato |
| M00344 | Asimilación del formaldehído, vía de la xilulosa monofosfato |
| M00148 | Succinato deshidrogenasa (ubiquinona) |
| M00152 | Complejo del citocromo bc1, Módulos de la vía del metabolismo energético |
| M00157 | ATPasa de tipo F, procariotas y cloroplastos |

| | |
|---------------|---|
| M00158 | ATPasa de tipo F, eucariotas |
| M00160 | ATPasa de tipo V, eucariotas |
| M00093 | Biosíntesis de la fosfatidiletanolamina (PE), PA => PS => PE |
| M00049 | Biosíntesis de los ribonucleótidos de adenina, IMP => ADP,ATP |
| M00050 | Biosíntesis de los ribonucleótidos de guanina IMP => GDP,GTP |
| M00052 | Biosíntesis de ribonucleótidos de pirimidina, UMP => UDP/UTP,CDP/CTP |
| M00053 | Biosíntesis del desoxirribonucleótido de pirimidina, CDP/CTP => dCDP/dCTP,dTDP/dTTP |
| M00609 | Biosíntesis de la cisteína, metionina => cisteína |
| M00034 | Vía de salvamento de la metionina |
| M00844 | Biosíntesis de la arginina, ornitina => arginina |
| M00845 | Biosíntesis de la arginina, glutamato => acetilcitrulina => arginina |
| M00029 | Ciclo de la urea |
| M00015 | Biosíntesis de prolina, glutamato => prolina |
| M00133 | Biosíntesis de poliaminas, arginina => agmatina => putrescina => espermidina |
| M00073 | Precusores de N-glicanos |
| M00079 | Degradación del sulfato de queratán |
| M00060 | KDO2-biosíntesis del lípido A, vía Raetz, tipo LpxL-LpxM |
| M00866 | KDO2-biosíntesis del lípido A, vía de Raetz, tipo no-LpxL-LpxM |
| M00140 | Interconversión de unidades C1, procariotas |
| M00141 | Interconversión de unidades C1, eucariotas |
| M00096 | Biosíntesis de isoprenoides C5, vía mevalonato |
| M00569 | Metacleavage de catecol, catecol => acetyl-CoA / 4-metilcatecol => propanoil-CoA |
| M00611 | Fotosíntesis oxigénica en plantas y cianobacterias |
| M00612 | Fotosíntesis anoxigénica en bacterias púrpuras |
| M00614 | Fotosíntesis anoxigénica en bacterias verdes del azufre |

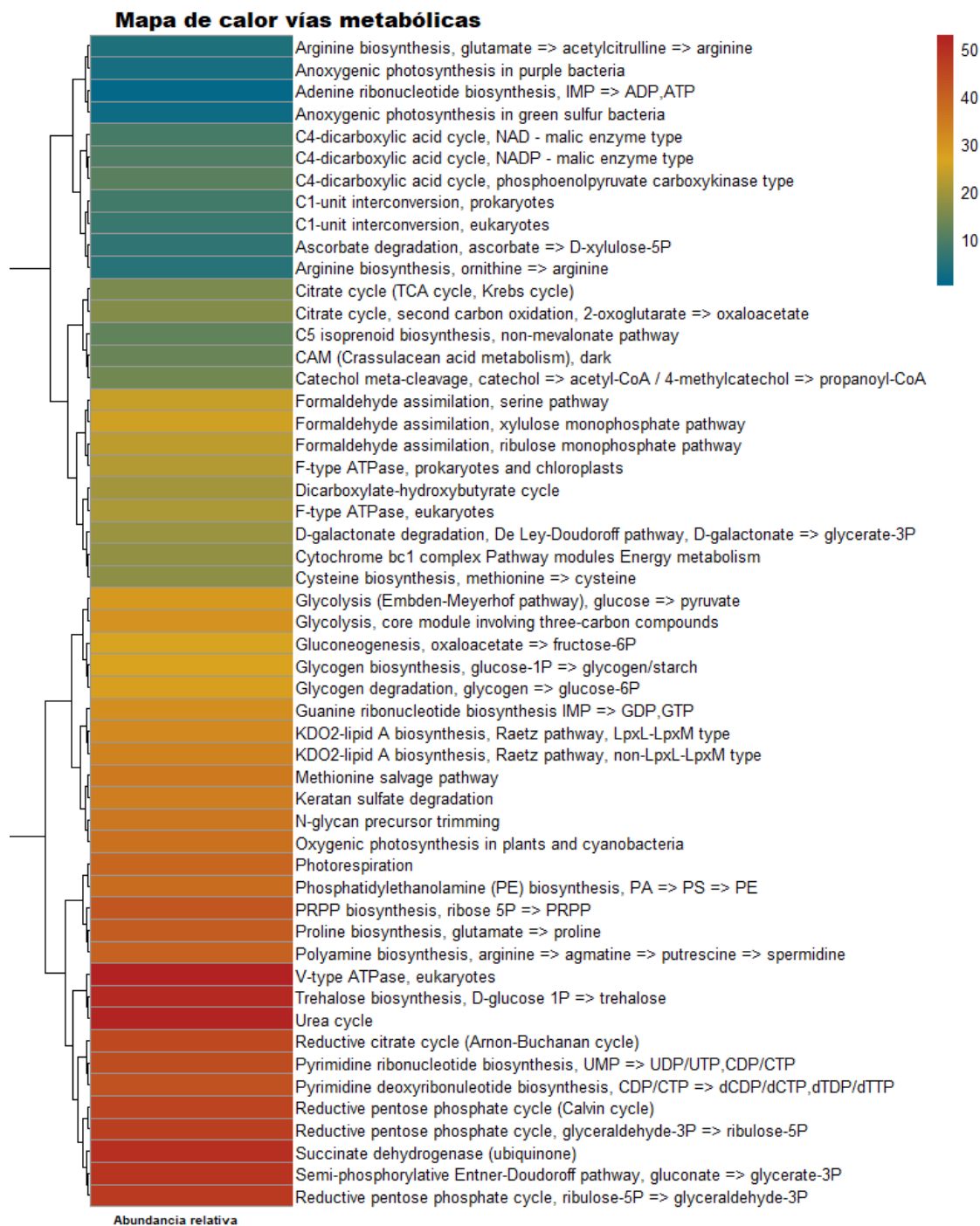


Figura 27. Mapa de calor de la abundancia relativa de las vías funcionales

8. DISCUSIONES

La diabetes mellitus está afectando a un número creciente de mujeres y aumentando el riesgo de complicaciones obstétricas. La obesidad, edad materna avanzada, el origen étnico y los antecedentes familiares de diabetes se han identificado consistentemente como los principales factores de riesgo para la DMG en estudios previos (Larrabure-Torrealva *et al.*, 2018). En el presente estudio, se analizaron los factores de edad, IMC y antecedentes familiares de diabetes determinando que las pacientes con DMG presentaron un IMC más elevado y mayor edad en comparación a las pacientes sanas. El 89% de las pacientes con DMG reportaron antecedentes familiares de DMT2 en comparación con las pacientes control (40%).

De acuerdo a Dall'Asta y colaboradores (2021) la obesidad puede ser un factor que contribuya a la disbiosis vaginal debido a que se reporta una mayor incidencia de vaginosis bacteriana en comparación con las mujeres con IMC normal (<25), lo que sugiere que la obesidad puede favorecer la aparición de VB a través de diferentes mecanismos que incluyen alteraciones en las funciones hormonales, metabólicas o inmunológicas, sin embargo no se determinaron diferencias significativas en este estudio (Anexo 4) debido a que solo una paciente presentaba un IMC normal, mientras que las 13 pacientes restantes presentaron sobrepeso u obesidad, por lo tanto no se pudo realizar una comparación con valor estadístico.

El papel del microbioma en la salud y en el desarrollo de varias enfermedades aún no se comprende totalmente, si bien hay una gran cantidad de investigaciones que vinculan la disbiosis del microbioma con una enfermedad en particular, se sabe poco sobre los mecanismos (Mousa *et al.*, 2022). Es común asociar los microorganismos faltantes o enriquecidos como *Lactobacillus* y *Gardnerella* con cambios en las interacciones microbianas y los metabolitos secretados, tiene efecto en el metabolismo del huésped y otras funciones corporales (Yadav *et al.*, 2018).

De acuerdo con la ADA, el sistema inmune de los pacientes diabéticos es débil, lo que dificulta su capacidad para combatir los microorganismos patógenos provocando una predisposición a infecciones (Shah y Hux, 2003; López-Simarro *et al.*, 2019). Bajo esta premisa, de acuerdo a los resultados del cuestionario clínico que se les aplicó a las pacientes con DMG, seis de ellas presentaron elevados niveles de glucosa por lo que requirieron tratamiento con metformina para la regulación de la hiperglucemia, al analizar este factor, solamente dos pacientes presentaron un

microbioma con disbiosis vaginal (DMG52 y DMG73), por lo que no es posible establecer una asociación entre microbiota y niveles de glucosa.

Se ha reportado que los niveles de glucosa en sangre fuera de rango producen varios cambios metabólicos, como un aumento en los niveles de glucógeno, lo cual puede causar un aumento notable de las especies de *Candida* (Mohammed *et al.*, 2021). Sin embargo, este género no se reportó en este estudio, por lo cual no es posible confirmar esta asociación.

Las mujeres sanas portan una variedad de microorganismos en la vagina, de los cuales *Lactobacillus* es el género dominante, el cual comprende hasta 50 especies, con una abundancia relativa del 60 al 90% (Zhang *et al.*, 2018). El presente estudio mostró que *Lactobacillus* es el género dominante tanto en DMG como en el grupo control con una abundancia relativa del 57% (de acuerdo a la secuenciación metagenómica) y 77% (de acuerdo a la secuenciación del gen ARNr 16S). La secuenciación metagenómica identificó 277 géneros y 501 especies dentro de las pacientes del grupo con DMG, mientras que dentro del grupo control solamente se identificaron 139 géneros y 233 especies. Las pacientes con diabetes mellitus gestacional presentan una microbiota más diversa y esto se puede observar en los valores del índice de diversidad de Shannon-Wiener, 1.404 vs 1.530 en pacientes control y con DMG respectivamente (secuenciación metagenómica) y 1.523 vs 1.915 en pacientes control y con DMG respectivamente de acuerdo a la secuenciación ARNr 16s.

Los estudios han concluido que las mujeres con comunidades dominadas por *Lactobacillus* presentan una menor probabilidad de padecer resultados adversos para la salud, lo que respalda el papel protector de estas especies (France *et al.*, 2022). Al analizar los CSTs, no se determinaron diferencias significativas entre el grupo con diabetes mellitus gestacional y el grupo control, incluso CST I (dominado por *L. crispatus*) se presentó en mayor proporción en las pacientes con DMG seguido de CST IV, el grupo DMG presentó más pacientes con condiciones de DV, sin embargo dentro del grupo control también se encontraron pacientes con características de DV.

En este estudio se hipotetizó que los factores que conllevan el padecer diabetes mellitus gestacional como el aumento de la inflamación, la resistencia a la insulina, IMC elevado y la generación de un entorno hiperglucémico en el epitelio vaginal alterarían la estructura de la microbiota cervicovaginal causando una disbiosis, sin embargo, ésta hipótesis se rechaza debido a que no se encontraron diferencias significativas en ambos grupos (Figura 20, Cuadro 18, Figura 17 y Figura 18). Es importante señalar que este estudio tuvo limitaciones debido al tamaño de muestra (n=14)

y los parámetros clínicos considerados, ya que no se consideraron diferentes factores que pueden influir en la presencia de DV. Se ha sugerido que la ubicación geográfica influye en la composición del microbioma, al igual que la variación genética, dieta, estilo de vida, edad, tiempo gestacional y patrones en el uso de antibióticos, entre otros factores (Abdill *et al.*, 2022; Mutlu *et al.*, 2018). A pesar de esto, se puede observar que la DMG no se asocia a la DV, ya que pacientes de ambos grupos presentaron un microbioma considerado saludable y también pacientes de ambos grupos presentaron DV. En ambos grupos hubo pacientes con sobrepeso u obesidad y antecedentes familiares de diabetes, por lo que la DV es multifactorial y no puede ser atribuida a una sola condición como la DMG. Sin embargo, es posible que la interacción entre DV y DMG cause mayores complicaciones en el embarazo que cada una por separado.

Dentro del estudio se identificaron dos especies patógenas de importancia clínica: *Neisseria gonorrhoeae* y *Alphapapillomavirus*. La infección por *N. gonorrhoeae* es una de las enfermedades bacterianas de transmisión sexual más comunes. Se ha informado que la cervicitis gonocócica no tratada en el embarazo puede provocar aborto espontáneo, prematuro asociado con corioamnionitis e infecciones de los ojos y la faringe de los recién nacidos (Suzuki *et al.*, 2019). *Alphapapillomavirus* es un virus del papiloma humano (VPH) que infecta los queratinocitos cutáneos y son el agente causal de prácticamente todos los casos de cáncer de cuello uterino. Sin embargo, las cepas (comúnmente denominadas tipos) dentro de este género abarcan todo el rango de patogenicidad, desde altamente cancerígenas hasta no cancerígeno (Van Doorslaer & Burk, 2010). Las pacientes que presentan *Alphapapillomavirus* pertenecen al grupo con diabetes mellitus gestacional DMG51 (0.75%) y DMG52 (1.54%). La presencia de gonorrea y del virus del papiloma humano en el embarazo aumentan probabilidad de parto prematuro y la ruptura prematura de membranas fetales, trastornos hipertensivos del embarazo, restricción del crecimiento fetal, bajo peso al nacer y muerte fetal intrauterina (Chilaka *et al.* 2021). Sin embargo, en este estudio no tenemos conocimiento de resultados adversos durante el embarazo.

Es importante indicar que independientemente de padecer o no DMG, la infección con SARS-CoV-2 en las mujeres embarazadas pueden manifestar síntomas graves y mayores riesgos de trastornos hipertensivos del embarazo, enfermedad trombótica, mayor riesgo de parto prematuro, la restricción del crecimiento intrauterino y una mayor tasa de parto por cesárea (Vouga *et al.*, 2021). Hay pocos estudios que indiquen los efectos de la DMG y COVID-19. Las mujeres embarazadas que presentan estas enfermedades tienen 3.3 veces más de probabilidades de ingresar

en una unidad de cuidados intensivos (UCI) que las mujeres sin DMG (Kleinwechter *et al.*, 2022). Sin embargo, en este estudio no se reportaron complicaciones en las pacientes que presentaron COVID-19 y DMG. Los cambios en la composición de la microbiota vaginal observados en mujeres embarazadas con infección activa por SARS-CoV-2 pueden ser consecuencia de alteraciones en el ambiente epitelial vaginal y la interacción del sistema inmunitario, lo cual puede limitar o favorecer la supervivencia de ciertos taxones (Leftwich *et al.*, 2022). En el caso de este estudio no se establecieron asociaciones significativas entre DV e infección previa por SARS-CoV-2 (Anexo 3), siendo solamente dos de cinco pacientes que presentaron condiciones de DV y una prueba de anticuerpos positiva (IgG+), las cuales pertenecían al grupo de DMG (DMG_16 y DMG_73).

En este estudio se comparó el rendimiento de la secuenciación shotgun y la secuenciación ARNr 16S para describir el perfil taxonómico a nivel de género. El análisis comparativo mostró que la secuenciación Shotgun recuperó más información sobre géneros de baja abundancia que la secuenciación 16S (Tabla 21). Aunque tanto el 16S como la secuenciación Shotgun permiten la caracterización del microbioma, la metagenómica Shotgun ofrece una mayor resolución, lo que permite una clasificación taxonómica y funcional más específica de las secuencias, así como el descubrimiento de nuevos genes y genomas bacterianos (Jovel *et al.*, 2016). La secuenciación del gen ARNr 16S es un método bien caracterizado que brinda información sobre la composición de las comunidades microbianas, a partir de un número relativamente pequeño de secuencias por muestra (~200 mil). Sin embargo, una limitación importante de este método es que los taxones se asignan sobre la base de la secuencia de una sola región del genoma bacteriano (Laudadio *et al.*, 2018).

Hasta la fecha, se han realizado numerosos estudios de secuenciación del gen ARNr 16S con el objetivo de comprender la microbiota vaginal, sin embargo, un factor limitante es la longitud de lectura corta que proporciona la secuenciación por amplicones. La secuenciación ARNr del gen 16S se considera actualmente como el estándar para la elaboración de perfiles del microbioma, debido a que este gen se encuentra presente en todas las bacterias y constituye una diana universal en la clasificación e identificación de bacterias y arqueas (Kim & Chun, 2014). En particular, se ha demostrado que ciertos taxones vaginales clave pueden estar subrepresentados o no ser detectados, según la región hipervariable. La región V1 a V3 distingue las especies de *Lactobacillus* predominantes, mientras que la región V3 a V5 distingue la familia *Enterobacteriaceae*

(incluyendo *Escherichia* y *Proteus*) y algunos géneros como *Staphylococcus* (Prince *et al.*, 2015). La región V3 por si misma presenta una longitud de 150 pb. Con este análisis no se pueden identificar virus, hongos y la mayoría de las especies de bacterias al menos que sean suficientemente diferentes en la región, por lo tanto no permite la identificación de los CSTs.

A pesar de las diferencias significativas entre ambos métodos, es importante mencionar que la secuenciación shotgun, puede no ser un reemplazo viable para la secuenciación ARNr 16S al caracterizar microbiomas de muestras de fluidos, donde es probable que haya más contaminación de ADN del huésped y una biomasa bacteriana relativamente baja (Hillmann *et al.*, 2018).

La asignación taxonómica es el componente principal del análisis de la comunidad microbiana; por lo tanto, la elección de la base de datos también es importante, ya que puede afectar el análisis posterior y la interpretación de la composición de la comunidad. En este estudio, se realizaron dos clasificaciones por medio de Kraken2 y SILVAv138, mostrando resultados similares a nivel Phyla, Familia y Género. Kraken2 utiliza un algoritmo que se basa en coincidencias exactas de k-mer, por lo que reemplaza el paso de alineación por una búsqueda en una base de datos que contiene cada k-mer de cada genoma con el identificador de especie. Si un k-mer aparece en dos o más taxones, se almacena el ancestro común más bajo, además, por medio de la base de datos “Standard” utiliza información taxonómica del NCBI así como los genomas completos en RefSeq para los dominios bacteriano, arqueal y viral, junto con el genoma humano y una colección de vectores conocidos (UniVec_Core) (Terrón-Camero *et al.*, 2022).

La base de datos SILVAv138 ha sido ampliamente utilizada para el análisis ARNr 16S debido a que busca crear una taxonomía estandarizada de bacterias y arqueas basada en la filogenia del genoma, lo que la convierte en una base de datos atractiva para algunos investigadores (Robeson *et al.*, 2021). Al utilizar esta base de datos por medio de DADA2 se basa en ASVs las cuales utilizan algoritmos con el propósito de eliminar los errores asociados con la secuenciación y devolver secuencias individuales y únicas que representan taxones individuales. Estas secuencias ASV difieren entre sí en un solo cambio de nucleótido mejorando la clasificación (Callahan *et al.*, 2017). De acuerdo a los estudios que se han reportado sobre asociación de la DMG y alteraciones en la microbiota vaginal, Cortez y colaboradores (2018) reportan a *Lactobacillus* como el género principal encontrado en el microbioma vaginal de ambos grupos el cual estaba ligeramente aumentado en el grupo control (80.68% vs 78.66%), En este estudio *Lactobacillus* también se reporta como el género dominante en ambos grupos tanto en la secuenciación ARNr 16S como

metagenómica. En el estudio de Zhang y colaboradores (2018) la bacteria más abundante en el grupo control fue *Lactobacillus crispatus* (28.5%) mientras que en el grupo con DMG *L. acidophilus* fue la especie más abundante (28.3%). Sin embargo este estudio reportó a *Lactobacillus crispatus* como la especie más abundante en ambos grupos (32.55% vs 37.43%). Estos resultados son importantes para una comprensión general del microbioma humano en la salud y la enfermedad, no obstante se necesita un estudio multifactorial.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, la hipótesis se rechaza debido que no se encontraron diferencias significativas en la composición de la microbiota vaginal entre mujeres sanas y con DMG, sin embargo, se encontró mayor diversidad de géneros y especies en las pacientes que presentaron DMG (índice Shannon-Wiener).

Los phyla *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* resultaron dominantes para todas las muestras, por lo tanto no se establecieron diferencias significativas entre grupos tanto en los resultados de la secuenciación metagenómica como en la región V3 del gen ARNr 16S. Los géneros *Lactobacillus*, *Fannyhessea* o *Atopobium*, *Gardnerella* y *Bifidobacterium* fueron los más representativos, *Lactobacillus* fue el género dominante tanto en pacientes DMG como en mujeres embarazadas sanas.

Este estudio determinó que la especie más abundante del género *Lactobacillus* fue *L. crispatus* en la microbiota vaginal de mujeres embarazadas sanas, seguido de *L. iners* y *L. johnsonii*, que es consistente con los resultados reportados de estudios anteriores. Por su parte, en las pacientes que padecen DMG, el orden fue *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. johnsonii*.

Es importante mencionar que en comparación con las mujeres embarazadas sanas, la abundancia de *L. iners* fue menor en las mujeres con DMG, por lo tanto, la proporción de las diferentes especies de *Lactobacillus* depende de una variedad de factores, por lo que no se puede identificar características distintivas que se asocien a DMG.

A excepción de una paciente, todas las pacientes presentaron sobrepeso y obesidad por lo que no se pudieron establecer asociaciones entre el IMC y la estructura de la microbiota vaginal.

No se estableció una asociación entre la estructura de la microbiota vaginal y la infección previa por SARS-CoV-2, debido a que solamente dos de cinco pacientes IgG+ presentaron condiciones de DV (ambas del grupo DMG).

Las condiciones de DV se pueden observar tanto en mujeres embarazadas sanas como diabéticas, no se descarta que la presencia conjunta de DV y DMG constituya un agravante y cause mayores complicaciones en el embarazo y el parto que cada una por separado.

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio metagenómico shotgun con un tamaño de muestra mayor que proporcione un mayor poder estadístico.
- Realizar seguimiento a la madre y al infante para establecer las afectaciones derivadas de la DMG.
- Ampliar este estudio para pacientes que reciben atención médica pública, debido a que en esta investigación las pacientes recibieron atención médica privada, lo cual pudo haber generado una menor varianza; algunos autores consideran el estado socioeconómico como un factor influyente en la estructura de la microbiota vaginal (Virtanen *et al.*, 2019).

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdill, R. J., Adamowicz, E. M., & Blekhman, R. (2022). Public human microbiome data are dominated by highly developed countries. *PLoS Biology*, 20(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001536>
- Abell, S. K., De Courten, B., Boyle, J. A., & Teede, H. J. (2015). Inflammatory and other biomarkers: Role in pathophysiology and prediction of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms160613442>
- Abou Chacra, L., & Fenollar, F. (2021). Exploring the global vaginal microbiome and its impact on human health. *Microbial Pathogenesis*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105172>
- Adachi, K. N., Nielsen-Saines, K., & Klausner, J. D. (2021). Chlamydia trachomatis Screening and Treatment in Pregnancy to Reduce Adverse Pregnancy and Neonatal Outcomes: A Review. *Frontiers in Public Health*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.531073>
- Adachi, K. N., Nielsen-Saines, K., & Klausner, J. D. (2021). Chlamydia trachomatis screening and treatment in pregnancy to reduce adverse pregnancy and neonatal outcomes: a review. *Frontiers in Public Health*, 561. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.531073>
- Albertsen, M., Karst, S. M., Ziegler, A. S., Kirkegaard, R. H., & Nielsen, P. H. (2015). Back to Basics - The Influence of DNA Extraction and Primer Choice on Phylogenetic Analysis of Activated Sludge Communities. *PLoS ONE* 10(7):e0132783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132783>
- Aldunate, M., Srbnovski, D., Hearps, A. C., Latham, C. F., Ramsland, P. A., Gugasyan, R., Cone R. A., & Tachedjian, G. (2015). Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Frontiers in physiology*, 6, 164. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00164>
- Amabebe, E., & Anumba, D. O. C. (2018). The vaginal microenvironment: The physiologic role of Lactobacilli. *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00181>
- American Diabetes Association (2020). Classification and Diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 43, S14–S31. <https://doi.org/10.2337/dc20-S002>
- American Diabetes Association (2022). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45, S17–S38. <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>
- Amir, M., Brown, J. A., Rager, S. L., Sanidad, K. Z., Ananthanarayanan, A., & Zeng, M. Y. (2020). Maternal microbiome and infections in pregnancy. *Microorganisms*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121996>
- Amsel, R., Totten, P. A., Spiegel, C. A., Chen, K. C. S., Eschenbach, D., & Holmes, K. K. (1983). Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *The*

- American Journal of Medicine, 74(1), 14–22. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(83\)91112-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(83)91112-9)
- Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Antonio, M. A. D., 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. <https://doi.org/10.1086/315109>
- Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, F., & Servin, A. L. (2006). *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48(3), 424–432. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00162.x>
- Auriemma, R. S., Sciarati, R., del Vecchio, G., Liccardi, A., Verde, N., Pirchio, R., Pivonello, R., Ercolini, D., & Colao, A. (2021). The Vaginal Microbiome: A Long Urogenital Colonization Throughout Woman Life. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.686167>
- Bayar, E., Bennett, P. R., Chan, D., Sykes, L., & MacIntyre, D. A. (2020). The pregnancy microbiome and preterm birth. *Seminars in Immunopathology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00817-w>
- Behboudi-Gandevani, S., Amiri, M., Bidhendi Yarandi, R., & Ramezani Tehrani, F. (2019). The impact of diagnostic criteria for gestational diabetes on its prevalence: A systematic review and meta-analysis. *Diabetology and Metabolic Syndrome*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0406-1>
- Bellamy, L., Casas, J. P., Hingorani, A. D., & Williams, D. (2009). Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 373(9677), 1773–1779. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60731-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60731-5)
- Belvoncikova, P., Splichalova, P., Videnska, P., & Gardlik, R. (2022). The Human Mycobiome: Colonization, Composition and the Role in Health and Disease. *Journal of Fungi*, 8(10), 1046. <https://doi.org/10.3390/jof8101046>
- Bhujel, R., Mishra, S. K., Yadav, S. K., Bista, K. D., & Parajuli, K. (2021). Comparative study of Amsel’s criteria and Nugent scoring for diagnosis of bacterial vaginosis in a tertiary care hospital, Nepal. *BMC Infectious Diseases*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06562-1>
- Bougherara, L., Hanssens, S., Subtil, D., Vambergue, A., & Deruelle, P. (2018). Diabetes gestacional. *EMC - Ginecología-Obstetricia*, 54(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/s1283-081x\(18\)88086-9](https://doi.org/10.1016/s1283-081x(18)88086-9)
- Breeding, K., Selbing, A., & Farneböck, M. (2020). Diagnosis of Bacterial Vaginosis Using a Novel Molecular Real-Time PCR Test. *J. Womens Health Gynecol*, 7, 1–7. <https://doi.org/10.17303/jwhg.2020.7.102>
- Callahan, B. J., DiGiulio, D. B., Aliaga Goltsman, D. S., Sun, C. L., Costello, E. K., Jeganathan, P., Biggio, J. R., Wong, R. J., Druzin, M. L., Shaw, G. M., Stevenson, D. K., Holmes, S., & Relman, D. A. (2017). Replication and refinement of a vaginal microbial signature of preterm birth in two racially distinct cohorts of US women. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 114(37), 9966–9971.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1705899114>

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, 11(12), 2639–2643.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Celik, E., Ozcan, G., Vatansever, C., Paerhati, E., Kuskucu, M. A., Dogan, O., Cekic, S. G., Ergonul, O., Gürsoy, A., Keskin, Ö., & Can, F. (2022). Alterations in Vaginal Microbiota among Pregnant Women with COVID-19. *Journal of Medical Virology*.
<https://doi.org/10.1002/jmv.28132>
- Chao, A. (1984). Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4), 265–270. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4615964>
- Chee, W. J. Y., Chew, S. Y., & Than, L. T. L. (2020). Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. *Microbial Cell Factories*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01464-4>
- Chen, C., Song, X., Wei, W., Zhong, H., Dai, J., Lan, Z., Li, F., Yu, X., Feng, Q., Wang, Z., Xie, H., Chen, X., Zeng, C., Wen, B., Zeng, L., Du, H., Tang, H., Xu, C., Xia, Y., Xia, H., Yang, H., Wang, J., Wang, J., Madsen, L., Brix, S., Kristiansen, K., Xu, X., Li, J., Wu, R., & Jia, H. (2017). The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00901-0>
- Chen, H., Wang, L., Zhao, L., Luo, L., Min, S., Wen, Y., Lei, W., Shu, M., & Li, Z. (2021). Alterations of Vaginal Microbiota in Women With Infertility and Chlamydia trachomatis Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.698840>
- Chen, J., Bittinger, K., Charlson, E. S., Hoffmann, C., Lewis, J., Wu, G. D., Lewis, J. D., Wu, G. D., Collman, R. G., Bushman, F. D., & Li, H. (2012). Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*, 28(16), 2106–2113. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts342>
- Chen, S., Xue, X., Zhang, Y., Zhang, H., Huang, X., Chen, X., Deng, G., Luo, S., & Gao, J. (2022). Vaginal Atopobium is Associated with Spontaneous Abortion in the First Trimester: a Prospective Cohort Study in China. *Microbiology Spectrum*, 10(2).
<https://doi.org/10.1128/spectrum.02039-21>
- Chen, X., Lu, Y., Chen, T., & Li, R. (2021). The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.631972>
- Chilaka, V. N., Navti, O. B., Al Beloushi, M., Ahmed, B., & Konje, J. C. (2021). Human papillomavirus (HPV) in pregnancy – An update. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 264, 340–348.

<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2021.07.053>

- Choudhury, A. A., & Devi Rajeswari, V. (2021). Gestational diabetes mellitus -A metabolic and reproductive disorder. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112183>
- Colonna, C., & Steelman, M. (2019). Amsel Criteria. *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31194459>
- Cortez, R. V., Taddei, C. R., Sparvoli, L. G., Ângelo, A. G. S., Padilha, M., Mattar, R., & Daher, S. (2019). Microbiome and its relation to gestational diabetes. *Endocrine*, 64(2), 254–264. <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1813-z>
- Dall’Asta, M., Laghi, L., Morselli, S., Re, M. C., Zagonari, S., Patuelli, G., Foschi, C., Pedna M. F., Sambri, V., Marangoni, A., & Danesi, F. (2021). Pre-Pregnancy Diet and Vaginal Environment in Caucasian Pregnant Women: An Exploratory Study. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.702370>
- Di Cianni, G., Miccoli, R., Volpe, L., Lencioni, C., & Del Prato, S. (2003). Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. <https://doi.org/10.1002/dmrr.390>
- Doerflinger, S. Y., Throop, A. L., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2014). Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *Journal of Infectious Diseases*, 209(12), 1989–1999. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu004>
- Domingo, J. J. S., & Sánchez, C. S. (2018). De la flora intestinal al microbioma. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110(1), 51-56. <https://dx.doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>
- Doyle, R., Gondwe, A., Fan, Y. M., Maleta, K., Ashorn, P., Klein, N., & Harris, K. (2018). A Lactobacillus-deficient vaginal microbiota dominates postpartum women in rural Malawi. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(6). <https://doi.org/10.1128/AEM.02150-17>
- Drell, T., Lillsaar, T., Tummeleht, L., Simm, J., Aaspõllu, A., Väin, E., Saarma, I., Salumets, A., Donders, G. G., & Metsis, M. (2013). Characterization of the Vaginal Micro- and Mycobiome in Asymptomatic Reproductive-Age Estonian Women. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054379>
- Enciso, K., (2016) Evaluación del cambio en la microbiota del contenido intestinal de camarón silvestre (*Penaeus vannamei*) sometido a diferentes condiciones de cultivo. Tesis de maestría. CIAD, México.
- 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 Bacteriology*, 49(1), 217–221. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-217>
- Farage, M. A., Miller, K. W., & Sobel, J. D. (2010). Dynamics of the Vaginal Ecosystem—Hormonal Influences. *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 3, IDRT.S3903. <https://doi.org/10.4137/idrt.s3903>
- Farrar, D. (2016). Hyperglycemia in pregnancy: Prevalence, impact, and management challenges.

- Federación Internacional de Diabetes. (2019). Atlas de la Diabetes de la FID (2019). Atlas de La Diabetes de La FID, 10(1), 1–169. Retrieved from http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf
- Fettweis, J. M., Paul Brooks, J., Serrano, M. G., Sheth, N. U., Girerd, P. H., Edwards, D. J., Strauss, J. F., Jefferson, K. K., & Buck, G. A. (2014). Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology (United Kingdom)*, 160, 2272–2282. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081034-0>
- France, M. T., Fu, L., Rutt, L., Yang, H., Humphrys, M. S., Narina, S., Gajer, P. M., Ma, B., Forney, L. J., & Ravel, J. (2022). Insight into the ecology of vaginal bacteria through integrative analyses of metagenomic and metatranscriptomic data. *Genome Biology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02635-9>
- France, M. T., Mendes-Soares, H., & Forney, L. J. (2016). Genomic comparisons of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus iners* reveal potential ecological drivers of community composition in the vagina. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24), 7063–7073. <https://doi.org/10.1128/AEM.02385-16>
- Fuochi, V., Cardile, V., Petronio Petronio, G., & Furneri, P. M. (2019). Biological properties and production of bacteriocins-like-inhibitory substances by *Lactobacillus* sp. strains from human vagina. *Journal of Applied Microbiology*, 126(5), 1541–1550. <https://doi.org/10.1111/jam.14164>
- Gao, X., He, J., Zhu, A., Xie, K., Yan, K., Jiang, X., Xu, Y., Li, Q., Xu, A., Ye, D., & Guo, J. (2021). Modelling gestational diabetes mellitus: large animals hold great promise. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09617-x>
- González-Pedraza, A., Mota, R., Ortiz, C., & Ponce, R. E. (2004). Factores de riesgo asociados a vaginosis bacteriana. *Atención Primaria*, 34(7), 360–365. [https://doi.org/10.1016/s0212-6567\(04\)79516-5](https://doi.org/10.1016/s0212-6567(04)79516-5)
- Goyal, A., Gupta, Y., & Tandon, N. (2022). Overt Diabetes in Pregnancy. *Diabetes Therapy*. Adis. <https://doi.org/10.1007/s13300-022-01210-6>
- Grimes, S. B., & Wild, R. (2000). Effect of Pregnancy on Lipid Metabolism and Lipoprotein Levels. *Endotext*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29714937>
- Gudnadottir, U., Debelius, J. W., Du, J., Hugerth, L. W., Danielsson, H., Schuppe-Koistinen, I., Fransson, E., & Brusselaers, N. (2022). The vaginal microbiome and the risk of preterm birth: a systematic review and network meta-analysis. *Scientific reports*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12007-9>
- Gupta, P., Singh, M. P., & Goyal, K. (2020). Diversity of Vaginal Microbiome in Pregnancy: Deciphering the Obscurity. *Frontiers in Public Health*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00326>
- Gupta, P., Singh, M. P., & Goyal, K. (2020). Diversity of vaginal microbiome in pregnancy: deciphering the obscurity. *Frontiers in public health*, 8, 326. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>

- Han, Y. W., Shen, T., Chung, P., Buhimschi, I. A., & Buhimschi, C. S. (2009). Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 38–47. <https://doi.org/10.1128/JCM.01206-08>
- Harlev, A., & Wiznitzer, A. (2010). New insights on glucose pathophysiology in gestational diabetes and insulin resistance. *Current Diabetes Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11892-010-0113-7>
- Herath, H., Herath, R., & Wickremasinghe, R. (2017). Gestational diabetes mellitus and risk of type 2 diabetes 10 years after the index pregnancy in Sri Lankan women - A community based retrospective cohort study. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179647>
- Hillmann, B., Al-Ghalith, G. A., Shields-Cutler, R. R., Zhu, Q., Gohl, D. M., Beckman, K. B., Knight, R., Knights, D. (2018). Evaluating the Information Content of Shallow Shotgun Metagenomics. *MSystems*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/msystems.00069-18>
- Hočevár, K., Maver, A., Vidmar Šimic, M., Hodžić, A., Haslberger, A., Premru Seršen, T., & Peterlin, B. (2019). Vaginal Microbiome Signature Is Associated With Spontaneous Preterm Delivery. *Frontiers in Medicine*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00201>
- Houttu, N., Mokkala, K., Saleem, W. T., Virtanen, S., Juhila, J., Koivuniemi, E., Pellonperä, O., Terti, K., Luokola, P., Sorsa, T. A., Salonen, A. H., Lahti, L., & Laitinen, K. (2022). Potential pathobionts in vaginal microbiota are affected by fish oil and/or probiotics intervention in overweight and obese pregnant women. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112841>
- Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Welch, D. M., Relman, D. A., & Sogin, M. L. (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255>
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2016). Diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo (Pregestacional y gestional): guía de práctica clínica. MSP. <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/320GER.pdf>
- Jakobsson, T., & Forsum, U. (2007). *Lactobacillus iners*: A marker of changes in the vaginal flora?. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.00558-07>
- Jones, A. (2019). Bacterial Vaginosis: A Review of Treatment, Recurrence, and Disparities. *Journal for Nurse Practitioners*, 15(6), 420–423. <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2019.03.010>
- Joseph, R. J., Ser, H. L., Kuai, Y. H., Tan, L. T. H., Arasoo, V. J. T., Letchumanan, V., Wang, L., Pusparajah, P., Goh, B. H., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., Lee, L. H. (2021). Finding a balance in the vaginal microbiome: How do we treat and prevent the occurrence of bacterial vaginosis? *Antibiotics*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060719>
- Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O'Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., Kao, D., Mason, A., Madsen, K., Wong, G. K. S. (2016). Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00459>
- Kalia, N., Singh, J., & Kaur, M. (2020). Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent

vulvovaginal infections: A critical review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>

Kampmann, U., Knorr, S., Fuglsang, J., & Ovesen, P. (2019). Determinants of Maternal Insulin Resistance during Pregnancy: An Updated Overview. *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/5320156>

Kandlikar, G. S., Gold, Z. J., Cowen, M. C., Meyer, R. S., Freise, A. C., Kraft, N. J. B., Moberg-Parker, J., Sprague, J., Kushner, D., & Curd, E. E. (2018). Ranacapa: An R package and Shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and interactive visualizations. *F1000Research*, 7, 1734. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16680.1>

Kervinen, K., Kalliala, I., Glazer-Livson, S., Virtanen, S., Nieminen, P., & Salonen, A. (2019). Vaginal microbiota in pregnancy: Role in induction of labor and seeding the neonate's microbiota? *Journal of Biosciences*. NLM (Medline). <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9925-z>

Kissinger, P. (2015). *Trichomonas vaginalis*: A review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infectious Diseases*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1055-0>

Kleinwechter, H. J., Weber, K. S., Mingers, N., Ramsauer, B., Schaefer-Graf, U.M., Groten, T., Kuschel, B., Backes, C., Banz-Jansen, C., Berghaeuser, M. A., Brotsack, I. A., Dressler-Steinbach, I., Engelbrecht, C., Engler-Hauschild, S., Gruber, T. M., Hepp, V., Hollatz-Galuschki, E., Iannaccone, A., Jebens, A., von Kaisenberg, C. S., Kaup, L., Keil, C., Kladt, C., Kolben, T., Kraft, K., Kunze, M., Lastinger, J., Luedemann, K., Manz, J., Morfeld, C. A., Parchmann, O., Pfaff, L., Reinhardt, K., Runkel, A., Schmidt, M., Sourouni, M., Stelbrink, J., Stubert, J., Stumpfe, F. M., Treptow, A., Rüdiger, M., Pecks, U. (2022). Gestational diabetes mellitus and COVID-19: results from the COVID-19-Related Obstetric and Neonatal Outcome Study (CRONOS). *Am J Obstet Gynecol*. PMID: 35580632; PMCID: PMC9107100. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2022.05.027>

Krüger, W., Vielreicher, S., Kapitan, M., Jacobsen, I. D., & Niemiec, M. J. (2019). Fungal-bacterial interactions in health and disease. *Pathogens*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens8020070>

Kunasegaran, T., Balasubramaniam, V. R. M. T., Arasoo, V. J. T., Palanisamy, U. D., & Ramadas, A. (2021). The modulation of gut microbiota composition in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus: A systematic review. *Biology*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/biology10101027>

Kwon, M. S., & Lee, H. K. (2022). Host and Microbiome Interplay Shapes the Vaginal Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 13, 919728. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.919728>

Łaniewski, P., & Herbst-Kralovetz, M. (2018). Vagina. *Encyclopedia of Reproduction*, 353–359. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.64406-9

Laredo-Aguilera, J. A., Gallardo-Bravo, M., Rabanales-Sotos, J. A., Cobo-Cuenca, A. I., & Carmona-Torres, J. M. (2020). Physical activity programs during pregnancy are effective for the control of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176151>

- Larrabure-Torrealva, G. T., Martinez, S., Luque-Fernandez, M. A., Sanchez, S. E., Mascaro, P. A., Ingar, H., Castillo, W., Zumaeta, R., Grande, M., Motta, V., Pacora, P. N., Gelaye, B. S., & Williams, M. A. (2018). Prevalence and risk factors of gestational diabetes mellitus: Findings from a universal screening feasibility program in Lima, Peru. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12884-018-1904-0>
- Laudadio, I., Fulci, V., Palone, F., Stronati, L., Cucchiara, S., & Carissimi, C. (2018). Quantitative Assessment of Shotgun Metagenomics and 16S rDNA Amplicon Sequencing in the Study of Human Gut Microbiome. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 22(4), 248–254. <https://doi.org/10.1089/omi.2018.0013>
- Lefkovits, Y. R., Stewart, Z. A., & Murphy, H. R. (2019). Gestational diabetes. *Medicine (United Kingdom)*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.11.006>
- Leftwich, H. K., Vargas-Robles, D., Rojas-Correa, M., Yap, Y. R., Bhattarai, S., Ward, D. V., Fujimori, G., Forconi, C. S., Yeboah, T., Carter, A., Kastrinakis, A., Asirwatham, A. M., Bucci, V., Moormann, A. M., & Maldonado-Contreras, A. (2022). Impact of SARS-CoV-2 on the microbiota of pregnant women and their infants. *medRxiv*, 2022-11. <https://doi.org/10.1101/2022.11.01.22281810>
- Lehtoranta, L., Hibberd, A. A., Yeung, N., Laitila, A., Maukonen, J., & Ouwehand, A. C. (2021). Characterization of vaginal fungal communities in healthy women and women with bacterial vaginosis (BV); a pilot study. *Microbial Pathogenesis*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105055>
- Lev-Sagie, A., De Seta, F., Verstraelen, H., Ventolini, G., Lonnee-Hoffmann, R., & Vieira-Baptista, P. (2022). The Vaginal Microbiome: II. Vaginal Dysbiotic Conditions. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. NLM (Medline). <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000644>
- Lewis, A. L., Deitzler, G. E., Ruiz, M. J., Weimer, C., Park, S. E., Robinson, L. S., Hallsworth-Pepin, K., Wollam, A. M., Mitreva, M. D., & Lewis, W. G. (2016). Genome sequences of 11 human vaginal Actinobacteria strains. *Genome Announcements*, 4(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00887-16>
- Lewis, F. M. T., Bernstein, K. T., & Aral, S. O. (2017). Vaginal microbiome and its relationship to behavior, sexual health, and sexually transmitted diseases. *Obstetrics and Gynecology*, 129(4), 643–654. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001932>
- Leyva-Gómez, G., Del Prado-Audelo, M. L., Ortega-Peña, S., Mendoza-Muñoz, N., Urbán-Morlán, Z., González-Torres, M., González, M., Figueroa-González, G., Reyes-Hernández, O. D., & Cortés, H. (2019). Modifications in vaginal microbiota and their influence on drug release: Challenges and opportunities. *Pharmaceutics*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050217>
- Li, D., Chi, X. Z., Zhang, L., Chen, R., Cao, J. R., Sun, X. Y., Yang, H., & Liao, Q. P. (2020). Vaginal microbiome analysis of healthy women during different periods of gestation. *Bioscience Reports*, 40(7). <https://doi.org/10.1042/BSR20201766>
- Li, D., Huang, Y., Sadykova, A., Zheng, W., Lin, L., Jin, C., Zhong, W., Liao, C., Pan, S. (2021). Composition of the microbial communities at different body sites in women with preterm birth and their newborns. *Medicine in Microecology*, 9.

<https://doi.org/10.1016/j.medmic.2021.100046>

- Li, D., Liu, C-M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T-W., (2015) MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, doi: 10.1093/bioinformatics/btv033 [PMID: 25609793].
- Lizárraga, D., & García-Gasca, A. (2021). The placenta as a target of epigenetic alterations in women with gestational diabetes mellitus and potential implications for the offspring. *Epigenomes*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/epigenomes5020013>
- López-Simarro, F., Redondo Margüello, E., Mediavilla Bravo, J. J., Soriano Llorca, T., Iturralde Iriso, J., & Hormigo Pozo, A. (2019). Prevención y tratamiento de la enfermedad infecciosa en personas con diabetes. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 45(2), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2018.07.007>
- Losa, F., Palacios, S., Rodríguez, S. P. G., Baquedano, L., & Khorsandi, D. (2022). Vaginal Dysbiosis Management and the Efficacy of a Non-Hormonal Hyaluronic Acid-Based Vaginal Gel (Palomacare®) as an Adjuvant Treatment: The Palomascopia Survey. *Obstet Gynecol Cases Rev*, 9, 222. DOI: 10.23937/2377-9004/1410222
- Ma, Z., & Li, L. (2017). Quantifying the human vaginal community state types (CSTs) with the species specificity index. *PeerJ*, 2017(6), e3366. <https://doi.org/10.7717/peerj.3366>
- MacIntyre, D. A., Chandiramani, M., Lee, Y. S., Kindinger, L., Smith, A., Angelopoulos, N., Lehne, B., Arulkumaran, S., Brown, R. G., Teoh, T. G., Holmes, E., Nicholson, J.K., Marchesi, J.R., & Bennett, P. R. (2015). The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep08988>
- Mañé, L., Flores-Le Roux, J. A., Benaiges, D., Chillarón, J. J., Prados, M., Pedro-Botet, J., Llauredó, G., Gortazar, L., Payà, A. (2019). Impact of overt diabetes diagnosed in pregnancy in a multi-ethnic cohort in Spain. *Gynecological Endocrinology*, 35(4), 332–336. <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1521387>
- Martin, D. H., & Marrazzo, J. M. (2016). The Vaginal Microbiome: Current Understanding and Future Directions. *Journal of Infectious Diseases*, 214, S36–S41. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw184>
- Mazziotti, F., Arena, V., Lo Mastro, F., La Torre, R., Fallucca, F., Di Biase, N., & Napoli, A. (1997). Diabetes and pregnancy: Prophylaxis of genital infections. *Annali Dell’Istituto Superiore Di Sanita*, 33(3), 343–345.
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E. R., & Damm, P. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meek, C. L. (2017). Natural selection? The evolution of diagnostic criteria for gestational diabetes. *Annals of Clinical Biochemistry*. SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/0004563216674743>

- Mendes-Soares, H., Suzuki, H., Hickey, R. J., & Forney, L. J. (2014). Comparative functional genomics of *Lactobacillus* spp. reveals possible mechanisms for specialization of vaginal lactobacilli to their environment. *Journal of Bacteriology*, 196(7), 1458–1470. <https://doi.org/10.1128/JB.01439-13>
- Miller, E. A., Beasley, D. A. E., Dunn, R. R., & Archie, E. A. (2016). Lactobacilli dominance and vaginal pH: Why is the human vaginal microbiome unique? *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01936>
- Mishra, S., Rao, C. R., & Shetty, A. (2016). Trends in the Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus. Scientifica. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/5489015>
- Mohammed, L., Jha, G., Malasevskaja, I., Goud, H. K., & Hassan, A. (2021). The Interplay Between Sugar and Yeast Infections: Do Diabetics Have a Greater Predisposition to Develop Oral and Vulvovaginal Candidiasis? *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.13407>
- Molina, M. A., Andralojc, K. M., Huynen, M. A., Leenders, W. P., & Melchers, W. J. (2022). In-depth insights into cervicovaginal microbial communities and hrHPV infections using high-resolution microbiome profiling. *NPJ biofilms and microbiomes*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00336-6>
- Moosa, Y., Kwon, D., de Oliveira, T., & Wong, E. B. (2020). Determinants of Vaginal Microbiota Composition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00467>
- Moumne, O., Hampe, M. E., Montoya-Williams, D., Carson, T. L., Neu, J., Francois, M., Rhoton-Vlasak, A. S., & Lemas, D. J. (2021). Implications of the vaginal microbiome and potential restorative strategies on maternal health: A narrative review. *Journal of Perinatal Medicine*. De Gruyter Open Ltd. <https://doi.org/10.1515/jpm-2020-0367>
- Mousa, W. K., Chehadeh, F., & Husband, S. (2022). Recent advances in understanding the structure and function of the human microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 13, 825338. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825338>
- Mutlu, E. A., Comba, I. Y., Cho, T., Engen, P. A., Yazıcı, C., Soberanes, S., Hamanaka, R. B., Niğdelioğlu, R., Meliton, A. Y., Ghio, A. J., Scott, G. R., & Mutlu, G. M. (2018). Inhalational exposure to particulate matter air pollution alters the composition of the gut microbiome. *Environmental Pollution*, 240, 817–830. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.130>
- Muzny, C. A., & Schwebke, J. R. (2020). Asymptomatic Bacterial Vaginosis: to Treat or Not to Treat? *Current Infectious Disease Reports*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s11908-020-00740-z>
- Nardini, P., Nāhui Palomino, R. A., Parolin, C., Laghi, L., Foschi, C., Cevenini, R., Vitali, B., & Marangoni, A. (2016). *Lactobacillus crispatus* inhibits the infectivity of *Chlamydia trachomatis* elementary bodies, in vitro study. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep29024>
- 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.297-301.1991>
- Nunn, K. L., & Forney, L. J. (2016). Unraveling the dynamics of the human vaginal microbiome.

- Nuriel-Ohayon, M., Neuman, H., & Koren, O. (2016). Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Frontiers in microbiology*, 1031. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01031>
- Nyirjesy, P., & Sobel, J. D. (2013). Genital mycotic infections in patients with diabetes. *Postgraduate Medicine*. <https://doi.org/10.3810/pgm.2013.05.2650>
- Ñahui Palomino, R. A., Zicari, S., Vanpouille, C., Vitali, B., & Margolis, L. (2017). Vaginal lactobacillus inhibits HIV-1 replication in human tissues ex vivo. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00906>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P., O'hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Szoecs, E., & Maintainer, H. W. (2019). Package “vegan”. A Community Ecology Package. *Community Ecology Package*, 2(9), 1–297. Retrieved from <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
- Oppermann, M. L., Campos, M. A., Hirakata, V. N., & Reichelt, A. J. (2022). Overt diabetes imposes a comparable burden on outcomes as pregestational diabetes: a cohort study. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13098-022-00939-1>
- Parra, G. I. M. (2015). Aspectos clínicos y diagnóstico de laboratorio de la vaginosis bacteriana. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 14(5), 611–623. <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v14n5/rhcm08515.pdf>
- Parrettini, S., Caroli, A., & Torlone, E. (2020). Nutrition and metabolic adaptations in physiological and complicated pregnancy: focus on obesity and gestational diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 611929. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.611929>
- Peebles, K., Velloza, J., Balkus, J. E., McClelland, R. S., & Barnabas, R. V. (2019). High Global Burden and Costs of Bacterial Vaginosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sexually Transmitted Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000972>
- Petrova, M. I., Reid, G., Vanechoutte, M., & Lebeer, S. (2017). Lactobacillus iners: Friend or Foe? *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.007>
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>
- Prince, A. L., Chu, D. M., Seferovic, M. D., Antony, K. M., Ma, J., & Aagaard, K. M. (2015). The perinatal microbiome and pregnancy: Moving beyond the vaginal microbiome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(6), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023051>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rafat, D. (2022). Gestational Diabetes Mellitus and Maternal Microbiome Alterations. In *Gestational Diabetes Mellitus - New Developments*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101868>
- Rahnemai, F. A., Abdi, F., Kazemian, E., Shaterian, N., Shaterian, N., & Behesht Aeen, F. (2022).

Association between body mass index in the first half of pregnancy and gestational diabetes: A systematic review. *SAGE Open Medicine*, 10, 20503121221109911. <https://doi.org/10.1177/20503121221109911>

- Ranjit, E., Raghubanshi, B. R., Maskey, S., & Parajuli, P. (2018). Prevalence of bacterial vaginosis and its association with risk factors among nonpregnant women: A hospital based study. *International Journal of Microbiology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8349601>
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C., Brotman, R., Davis, C. C., Ault, K. A., Peralta, L. M., & Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
- Reekie, J., Roberts, C., Preen, D., Hocking, J. S., Donovan, B., Ward, J., Mak, D., Liu, B., Guy, R., Kaldor, J., Pearson, S. A., Stewart, L. M., & Wand, H. (2018). Chlamydia trachomatis and the risk of spontaneous preterm birth, babies who are born small for gestational age, and stillbirth: a population-based cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(4), 452–460. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30045-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30045-8)
- Reyes-Muñoz, E., Parra, A., Castillo-Mora, A., & Ortega-González, C. (2012). Effect of the diagnostic criteria of the international association of diabetes and pregnancy study groups on the prevalence of gestational diabetes mellitus in urban mexican women: A cross-sectional study. *Endocrine Practice*, 18(2), 146–151. <https://doi.org/10.4158/EP11167.OR>
- Romero, R., Hassan, S. S., Gajer, P., Tarca, A. L., Fadrosh, D. W., Nikita, L., Galuppi, M., Lamont, R. F., Chaemsaitong, P., Miranda, J., Chaiworapongsa, T., & Ravel, J. (2014). The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-4>
- Salazar-Petres, E. R., & Sferruzzi-Perri, A. N. (2022). Pregnancy-induced changes in β -cell function: what are the key players? *Journal of Physiology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1113/JP281082>
- Sapra A, Bhandari P. Diabetes. (2023) Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 31855345. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551501/>
- Saraf, V. S., Sheikh, S. A., Ahmad, A., Gillevet, P. M., Bokhari, H., & Javed, S. (2021). Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Archives of Microbiology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02414-3>
- Schliep, K. P. (2011). Phangorn: Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Seña, A. C., Miller, W. C., Hobbs, M. M., Schwebke, J. R., Leone, P. A., Swygard, H., Atashili, J., & Cohen, M. S. (2007). *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: Implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 44(1), 13–22. <https://doi.org/10.1086/511144>
- Sexton, H., Heal, C., Banks, J., & Braniff, K. (2018). Impact of new diagnostic criteria for gestational diabetes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 44(3), 425–431. <https://doi.org/10.1111/jog.13544>

- Shah, B. R., & Hux, J. E. (2003). Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care*, 26(2), 510–513. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.2.510>
- Sharma, A. K., Singh, S., Singh, H., Mahajan, D., Kolli, P., Mandadapu, G., Kumar, B., Kumar, D., Kumar, S., Jena, M. K. (2022). Deep Insight of the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Cells*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11172672>
- Shen, L., Zhang, W., Yuan, Y., Zhu, W., & Shang, A. (2022). Vaginal microecological characteristics of women in different physiological and pathological period. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1071.
- Sirota, I., Zarek, S. M., & Segars, J. H. (2014). Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. *Seminars in Reproductive Medicine*, 32(1), 35–42. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361821>
- Stern, C., Schwarz, S., Moser, G., Cvitic, S., Jantscher-Krenn, E., Gauster, M., & Hiden, U. (2021). Placental endocrine activity: Adaptation and disruption of maternal glucose metabolism in pregnancy and the influence of fetal sex. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222312722>
- Stewart, Z. A. (2020). Gestational diabetes. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*. Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.ogrm.2019.12.005>
- Sungur, T., Aslim, B., Karaaslan, C., & Aktas, B. (2017). Impact of Exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa). *Anaerobe*, 47, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.013>
- Sutton, M., Sternberg, M., Koumans, E. H., McQuillan, G., Berman, S., & Markowitz, L. (2007). The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clinical Infectious Diseases*, 45(10), 1319–1326. <https://doi.org/10.1086/522532>
- Suzuki, S., Hoshi, S. ichi, Sekizawa, A., Sagara, Y., Tanaka, M., Kinoshita, K., & Kitamura, T. (2019). Current status of *Neisseria gonorrhoeae* cervicitis in pregnant women in Japan. *PLoS ONE*, 14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211595>
- Tachedjian, G., Aldunate, M., Bradshaw, C. S., & Cone, R. A. (2017). The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Research in Microbiology*, 168(9–10), 782–792. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.04.001>
- Taddei, C. R., Cortez, R. V., Mattar, R., Torloni, M. R., & Daher, S. (2018). Microbiome in normal and pathological pregnancies: A literature overview. In *American Journal of Reproductive Immunology* (Vol. 80). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/aji.12993>
- Tamarelle, J., Thiébaud, A. C., De Barbeyrac, B., Bebear, C., Ravel, J., & Delarocque-Astagneau, E. (2019). The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(1), 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.019>
- Terrón-Camero, L. C., Gordillo-González, F., Salas-Espejo, E., & Andrés-León, E. (2022). Comparison of Metagenomics and Metatranscriptomics Tools: A Guide to Making the Right Choice. *Genes*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/genes13122280>

- Tomás, M., Palmeira-de-Oliveira, A., Simões, S., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, R. (2020). Bacterial vaginosis: Standard treatments and alternative strategies. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119659>
- Torcia, M. G. (2019). Interplay among vaginal microbiome, immune response and sexually transmitted viral infections. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20020266>
- Tyssen, D., Wang, Y.-Y., Hayward, J. A., Agius, P. A., DeLong, K., Aldunate, M.,... Tachedjian, G. (2018). Anti-HIV-1 Activity of Lactic Acid in Human Cervicovaginal Fluid. *MSphere*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/msphere.00055-18>
- Van de Wijgert, J. H. H. M., & Jaspers, V. (2017). The global health impact of vaginal dysbiosis. *Research in Microbiology*, 168(9–10), 859–864. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.02.003>
- Van den Munckhof, E. H. A., van Sitter, R. L., Boers, K. E., Lamont, R. F., te Witt, R., le Cessie, S., Knetsch, C. W., van Doorn, L. J., Quint, W., Moliijn, A. C., & Leverstein-van Hall, M. A. (2019). Comparison of Amsel criteria, Nugent score, culture and two CE-IVD marked quantitative real-time PCRs with microbiota analysis for the diagnosis of bacterial vaginosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03538-7>
- Van Doorslaer, K., & Burk, R. D. (2010). Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. *Advances in Virus Research* (Vol. 77, pp. 41–62). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385034-8.00002-8>
- Van Gerwen, O. T., Muzny, C. A., & Marrazzo, J. M. (2022). Sexually transmitted infections and female reproductive health. *Nature Microbiology*, 7(8), 1116–1126. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01177-x>
- Vaneechoutte, M. (2017). *Lactobacillus iners*, the unusual suspect. *Research in Microbiology*, 168(9–10), 826–836. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.09.003>
- Vazquez, F., Fernández-Blázquez, A., & García, B. (2019). Vaginosis. *Microbiota vaginal. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(9), 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.11.009>
- Virtanen, S., Rantsi, T., Virtanen, A., Kervinen, K., Nieminen, P., Kalliala, I., & Salonen, A. (2019). Vaginal Microbiota Composition Correlates Between Pap Smear Microscopy and Next Generation Sequencing and Associates to Socioeconomic Status. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44157-8>
- Vouga, M., Favre, G., Martinez-Perez, O., Pomar, L. A., cebal, L. A., bascal-Saiz, A., Hernandez, M., Hcini, N., Lambert, V., Carles, G., Sichitiu, J., Salomon, L., Stirnemann, J., Ville, Y., de Tejada, B., Goncé, A., Hawkins-Villarreal, A., Castillo, K., Solsona, E., Trigo, L., Cleary, B., Geary, M., Bartels, H., Al-Kharouf, F., Malone, F., Higgins, M., Keating, N., Knowles, S., Poncelet C., Ribeiro-do-Valle, C., Surita, F., Dantas-Silva, A., Borrelli, C., Luz, A., Fuenzalida, J., Carvajal, J., Canales, M., Hernandez, O., Grechukhina, O., Ko, A., Reddy, U., Figueiredo, R., Moucho, M., Pinto, P., De Luca, C., De Santis, M., de Campos, D., Martins, I., Garabedian, C., Subtil, D., Bohrer, B., Da Rocha Oppermann, M., Wender, M.,

- Schuler-Faccini, L., Sanseverino, M., Giugliani, C., Friedrich, L., Scherer, M., Mottet, N., Ducarme, G., Pelerin, H., Moreau, C., Breton, B., Quibel, T., Rozenberg, P., Giannoni, E., Granado, C., Monod, C., Mueller, D., Hoesli, I., Bassler, D., Heldstab, S., Kölbl, N., Sentilhes, L., Charvet, M., Deprest, J., Richter, J., Van der Veeken, L., Eggel-Hort, B., Plantefeve, G., Derouich, M., Calvache, A., Lopez-Giron, M., Burgos-Luna, J., Escobar-Vidarte, M., Hecher, K., Tallarek, A., Hadar, E., Haratz, K., Amikam, U., Malinger, G., Maymon, R., Yogev, Y., Schäffer, L., Toussaint, A., Rossier, M., De Sa, R., Grawe, C., Aebi-Popp, K., Radan, A., Raio, L., Surbek, D., Böckenhoff, P., Strizek, B., Kaufmann, M., Bloch, A., Boulvain, M., Johann, S., Heldstab, S., Bernasconi, M., Grant, G., Feki, A., Brochut, A., Giral, M., Sedille, L., Papadia, A., Brugger, R., Weber, B., Fischer, T., Kahlert, C., Saines, K., Cambou, M., Kanellos, P., Chen, X., Yin, M., Haessig, A., Ackermann, S., Baud, D., Panchaud, A. (2021). Maternal outcomes and risk factors for COVID-19 severity among pregnant women. *Scientific Reports*, 11(1), 13898. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92357-y>
- Wang, H., Li, N., Chivese, T., Werfalli, M., Sun, H., Yuen, L., Hoegfeldt, C. A., Elise, P. C., Immanuel, J., Karuranga, S., Divakar, H. R., Levitt, N. S., Li, C., Simmons, D., & Yang, X. (2022). IDF Diabetes Atlas: Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109050>
- Wickham H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- World Health Organization. (2011). Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, syphilis and *trichomonas vaginalis*: methods and results used by WHO to generate 2005 estimates. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44735>
- World Health Organization. (2016). WHO guidelines for the treatment of *Chlamydia trachomatis*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246165/9789241549714-eng.pdf>
- Yadav, M., Verma, M. K., & Chauhan, N. S. (2018). A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. *Archives of Microbiology*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1459-x>
- Yong, H. Y., Mohd Shariff, Z., Mohd Yusof, B. N., Rejali, Z., Tee, Y. Y. S., Bindels, J., & van der Beek, E. M. (2020). Independent and combined effects of age, body mass index and gestational weight gain on the risk of gestational diabetes mellitus. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65251-2>
- Zaheer, R., Noyes, N., Ortega Polo, R., Cook, S. R., Marinier, E., Van Domselaar, G., Belk, K. E., Morley, P. S., & McAllister, T. A. (2018). Impact of sequencing depth on the characterization of the microbiome and resistome. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24280-8>
- Zaki, M. E. S., Raafat, D., Emshaty, W. E., Azab, M. S., & Goda, H. (2010). Correlation of *Trichomonas vaginalis* to bacterial vaginosis: A laboratory-based study. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4(3), 156–163. <https://doi.org/10.3855/jidc.434>

- Zera, C. A., & Seely, E. W. (2021). Controversies in gestational diabetes. *European Endocrinology. Touch Briefings*. <https://doi.org/10.17925/EE.2021.17.2.102>
- Zhang, C., & Ning, Y. (2011). Effect of dietary and lifestyle factors on the risk of gestational diabetes: Review of epidemiologic evidence. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 94). <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001032>
- Zhang, C., Rawal, S., & Chong, Y. S. (2016). Risk factors for gestational diabetes: is prevention possible? *Diabetologia*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3979-3>
- Zhang, X., Liao, Q., Wang, F., & Li, D. (2018). Association of gestational diabetes mellitus and abnormal vaginal flora with adverse pregnancy outcomes. *Medicine (United States)*, 97(34). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011891>
- Zheng, N., Guo, R., Wang, J., Zhou, W., & Ling, Z. (2021). Contribution of *Lactobacillus iners* to Vaginal Health and Diseases: A Systematic Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.792787>
- Zwittink, R. D., van den Munckhof, E. H. A., Leverstein-van Hall, M. A., Boers, K., Molijn, A., Knetsch, C. W., & Kuijper, E. J. (2021). The vaginal microbiota in the course of bacterial vaginosis treatment. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 40(3), 651–656. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04049-6>

12. ANEXOS

12.1 Cuestionario Aplicado a las Pacientes de Estudio y Aprobación del Comité de Ética



UC San Diego
School of Medicine



Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
Universidad de California, San Diego
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Mazatlán, A.C.

CUESTIONARIO DE DATOS DE LA PACIENTE

Proyecto de Investigación Clínica UC MEXUS-CONACYT No. CN-19-39

Llenar los datos con bolígrafo y resguardar el documento en el expediente clínico de la paciente
(Fill in the data with a pen and keep the document in the patient's clinical file)

| Datos del Médico (Physician Information) |
|--|
| Nombre completo (Full name): _____ |
| Teléfono (Phone): _____ Correo electrónico (e-mail): _____ |
| Cédula Profesional (Professional ID): _____ |

| Datos Personales de la Paciente (Personal Information of the Patient) |
|---|
| Nombre completo (Full name): _____ |
| Edad (Age): _____ años (years) Nacionalidad (Nationality): _____ |
| Peso (Weight): _____ kg Estatura (Height): _____ cm |
| Medida cintura (Waist measurement): _____ cm Peso del padre (Father's weight): _____ kg |
| Estatura del padre (Father's height): _____ cm |

| Datos Clínicos (Clinical data) |
|--|
| Número de expediente clínico (Medical Record Number): _____ |
| Antecedentes familiares de diabetes (Family history of diabetes) <input type="checkbox"/> SI (YES) <input type="checkbox"/> NO |
| Si la respuesta es SI, ¿cuál es el parentesco con la paciente?: _____ (If YES, what is the relationship with the patient?) |
| Tipo de diabetes (Type of diabetes): <input type="checkbox"/> T1 <input type="checkbox"/> T2 <input type="checkbox"/> Gestacional (Gestational) |
| Antecedentes familiares de diabetes por parte del padre <input type="checkbox"/> SI (YES) <input type="checkbox"/> NO (Family history of diabetes for the father-of-the-baby) |
| Si la respuesta es SI, ¿cuál es el parentesco con el padre?: _____ (If YES, what is the relationship with the father-of-the-baby?) |
| Tipo de diabetes (Type of diabetes): <input type="checkbox"/> T1 <input type="checkbox"/> T2 <input type="checkbox"/> Gestacional (Gestational) |



Este documento es para uso exclusivo de personal médico e investigadores participantes
Av. Sábalo-Cerritos, S/N, CP 82112, Mazatlán, Sinaloa, México
+52 (669) 989 8700 | ucmexus.mzt@ciad.mx | www.ciad.mx
F-001 R 00 Página 1 de 2





CUESTIONARIO DE DATOS DE LA PACIENTE

Proyecto de Investigación Clínica UC MEXUS-CONACYT No. CN-19-39

| Uso de Medicamentos (<i>Medications</i>) | |
|---|--|
| - Uso de antibióticos (<i>Antibiotics</i>): | <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI, cuál(es) (<i>YES, which</i>): _____ |
| - Uso de probióticos (<i>Probiotics</i>): | <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI, cuál(es) (<i>YES, which</i>): _____ |
| - Uso de insulina (<i>Insulin</i>): | <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI |
| - Uso de inhibidores de bombas de protones (Ej. Omeprazol) (<i>Use of proton pump inhibitors (such as Omeprazole)</i>) | <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI, cuál(es) (<i>YES, which</i>): _____ |
| - Uso de antidiabéticos (Ej. Metformina) (<i>Use of oral medications for diabetes, such as Metformin</i>) | <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI, cuál(es) (<i>YES, which</i>): _____ |

| Análisis Clínicos (<i>Clinical laboratory tests</i>) | |
|---|--|
| <u>Se debe anexar copia de todos los estudios clínicos realizados (<i>Attach copies of lab results</i>)</u> | |
| <input type="checkbox"/> Estreptococo Grupo B (<i>Group B Streptococcus</i>) | <input type="checkbox"/> Examen General de Orina (EGO) (<i>Urinalysis</i>) |
| <input type="checkbox"/> Urocultivo (<i>Urine culture</i>) | <input type="checkbox"/> Curva de Tolerancia a la Glucosa oral (75 g) a la hora (<i>Oral Glucose Tolerance test (75g), one hour timepoint</i>) |
| <input type="checkbox"/> Glucosa en ayunas (<i>Fasting glucose</i>) | <input type="checkbox"/> Curva de Tolerancia a la Glucosa oral (75 g) a las 2 horas. (<i>Oral Glucose Tolerance test (75g), two hour timepoint</i>) |
| <input type="checkbox"/> Insulina en ayunas (<i>Fasting insulin</i>) | <input type="checkbox"/> Hemoglobina Glucosilada (HbA1c) (<i>Glycosylated Hemoglobin (HbA1c)</i>) |

| Datos del Parto (<i>Delivery information</i>) | |
|--|---|
| Procedimiento (<i>Procedure</i>): | <input type="checkbox"/> Parto (<i>Vaginal</i>) <input type="checkbox"/> Cesárea (<i>C-section</i>) |
| Sexo del bebé (<i>Sex of the baby</i>): | <input type="checkbox"/> Femenino (<i>Female</i>) <input type="checkbox"/> Masculino (<i>Male</i>) |
| Peso del bebé (<i>Weight of the baby</i>): | _____ kg |
| Estatura del bebé (<i>Height of the baby</i>): | _____ cm |

Observaciones (*Observations*):





COMITÉ DE ÉTICA

CE/002/2020

Hermosillo, Sonora. Enero 14, 2020

Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Profesor Investigador Titular del Lab. De Biología Molecular y Celular
Coordinación Regional Mazatlán, Sinaloa México
CIAD
Presente

Estimada Dra. Silvia García:


Me permito comunicarle que el Comité de Ética de nuestro centro ha revisado cuidadosamente la propuesta de investigación "Primera Aproximación al Estudio de la Metilación Global del ADN y la Composición del Microbioma en Mujeres con Diabetes Mellitus Gestacional" del cual usted es el responsable técnico, y se le exponen las siguientes recomendaciones:

1. El responsable técnico presenta un protocolo bien organizado y estructurado de un estudio clasificado como un estudio con riesgo mínimo de acuerdo con el artículo 17 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud de la Secretaría de Salud.
2. En los puntos 25 y 30 de la forma para la aprobación del proyecto, el responsable técnico debe incluir los nombres de las personas que tendrán acceso a las muestras, resultados y datos durante el curso del estudio, así como de aquel personal que vigilará las todas las actividades del mismo.
3. El CEI no entiende con claridad el número de muestras de heces que coleccionará en total durante el estudio. En el protocolo se menciona que se coleccionarán 2 muestras fecales por madre y una sola muestra por recién nacido (Tabla 3). En el formato de solicitud para revisión ética, se menciona que se trabajará con 96 madres. El total de muestras fecales sería de 288. Sin embargo, en el anexo 6 del acuerdo de transferencia de material biológico se menciona que se coleccionarán 384.
4. En el punto 9 del consentimiento informado del anexo 1 del protocolo, se menciona un listado de médicos especialistas que formarán parte de este estudio. Sin embargo, en el anexo 7 se observa un cuadro con la lista que se menciona en "construcción". Es recomendable, que el responsable tenga ese cuadro completo antes de iniciar el estudio.

5. Tanto en la carta de consentimiento como en el anexo 5, el responsable debe mencionar en las unidades correspondientes, las cantidades de muestra placentaria que se tomarán por cada parte (materna, central, fetal).

Por lo anterior y a reserva de la atención que reciban las recomendaciones anteriores, el CEI de CIAD ha aprobado la realización del estudio en los términos planteados, para lo cual le desea el mejor de los éxitos.

Sin más, en representación de los miembros de nuestro comité, le deseo el mayor de los éxitos.

Atentamente

Dr. Luis Quihui Cota
Presidente del Comité de Ética en Investigación de CIAD
C.c.p. Archivo



12.2. Protocolo de Extracción de ADN

1. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 μ L y se centrifugaron a 13200 rpm por 3 minutos.
2. Se resuspendió cada pellet en 180 μ L de Buffer ATL y se adicionaron 20 μ L de proteinasa K, se mezcló con vortex y cada muestra se incubó a 56°C en un thermoblock por 10 minutos.
3. Se adicionaron 200 μ L de Buffer AL a cada muestra y se incubaron a 70°C en un thermoblock por 10 minutos.
4. Después de incubar las muestras a 70°C, se adicionó etanol (96-100%) y se mezclaron con vórtex.
5. Se colocó cada muestra en las columnas que incluye el kit y se centrifugaron a 8000 rpm por 1 minuto. Se descartó el tubo de colección que contenía el filtrado y se reemplazó por otro tubo de colección que incluye el kit.
6. Se adicionaron 500 μ L de Buffer AW1 en cada tubo de colección y se centrifugaron a 8000 rpm por 1 minuto. Se descartó el tubo de colección que contenía el filtrado y se reemplazó por otro

tubo de colección que incluye el kit.

7. Se adicionaron 500 μL de Buffer AW2 a cada tubo de colección y se centrifugaron 13200 rpm por 3 minutos.
8. Se colocó la columna en un nuevo tubo de colección y se centrifugó a 13200 rpm por 1 minuto para evitar alguna posible transferencia de Buffer AW2.
9. Se colocó cada columna en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 μL y se eluyeron las muestras con 50 μL de Buffer de elución AE. La muestra se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos para aumentar el rendimiento del ADN.
10. Por último, se centrifugó cada columna que contenía el tubo Eppendorf estéril a 8000 rpm por un minuto.

12.3. Diferencias en la Estructura Cervicovaginal de Pacientes que Presentaron COVID-19 Durante el Embarazo (Prueba de Anticuerpos Positiva).

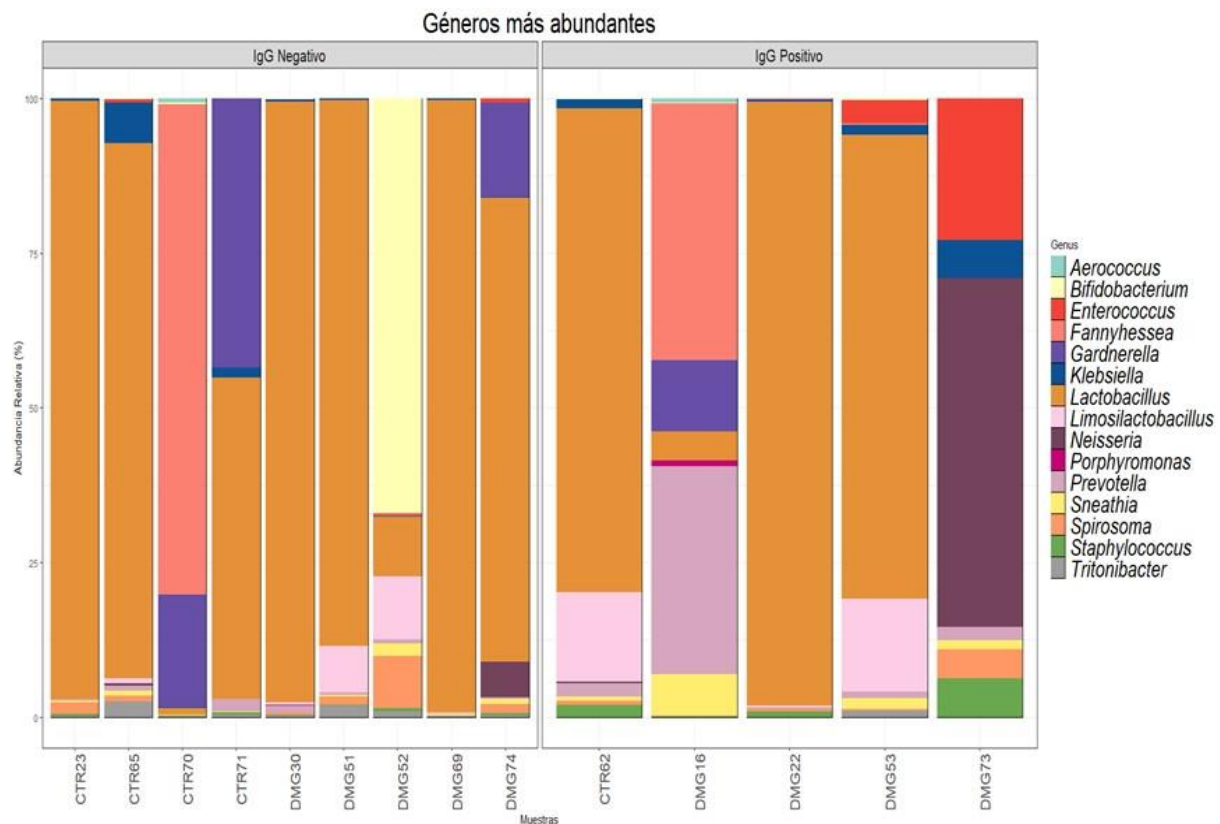


Figura 28 .Composición taxonómica, los colores representan los 15 géneros con mayor abundancia relativa (%).Las muestras se indican en el eje x.

Cuadro 23. Abundancia relativa de los 15 géneros más abundantes

| Género | IgG Negativo | Género | IgG Positivo |
|---------------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| <i>Lactobacillus</i> | 63.73% | <i>Lactobacillus</i> | 45.33% |
| <i>Fannyhessea</i> | 8.62% | <i>Fannyhessea</i> | 7.99% |
| <i>Limosilactobacillus</i> | 8.12% | <i>Gardnerella</i> | 7.67% |
| <i>Porphyromonas</i> | 6.95% | <i>Neisseria</i> | 7.27% |
| <i>Prevotella</i> | 1.95% | <i>Prevotella</i> | 4.92% |
| <i>Staphylococcus</i> | 1.52% | <i>Bifidobacterium</i> | 3.72% |
| <i>Sneathia</i> | 0.93% | <i>Limosilactobacillus</i> | 2.21% |
| <i>Gardnerella</i> | 0.66% | <i>Enterococcus</i> | 1.89% |
| <i>Leptospira</i> | 0.66% | <i>Spirosoma</i> | 1.56% |
| <i>Neisseria</i> | 0.56% | <i>Sneathia</i> | 1.39% |
| <i>Enterococcus</i> | 0.49% | <i>Klebsiella</i> | 1.35% |
| <i>Brevundimonas</i> | 0.33% | <i>Escherichia</i> | 1.10% |
| <i>Paracoccus</i> | 0.29% | <i>Staphylococcus</i> | 0.87% |
| <i>Candidatus Nanopelagicus</i> | 0.257% | <i>Cutibacterium</i> | 0.83% |
| <i>Weissella</i> | 0.19% | <i>Brevundimonas</i> | 0.76% |

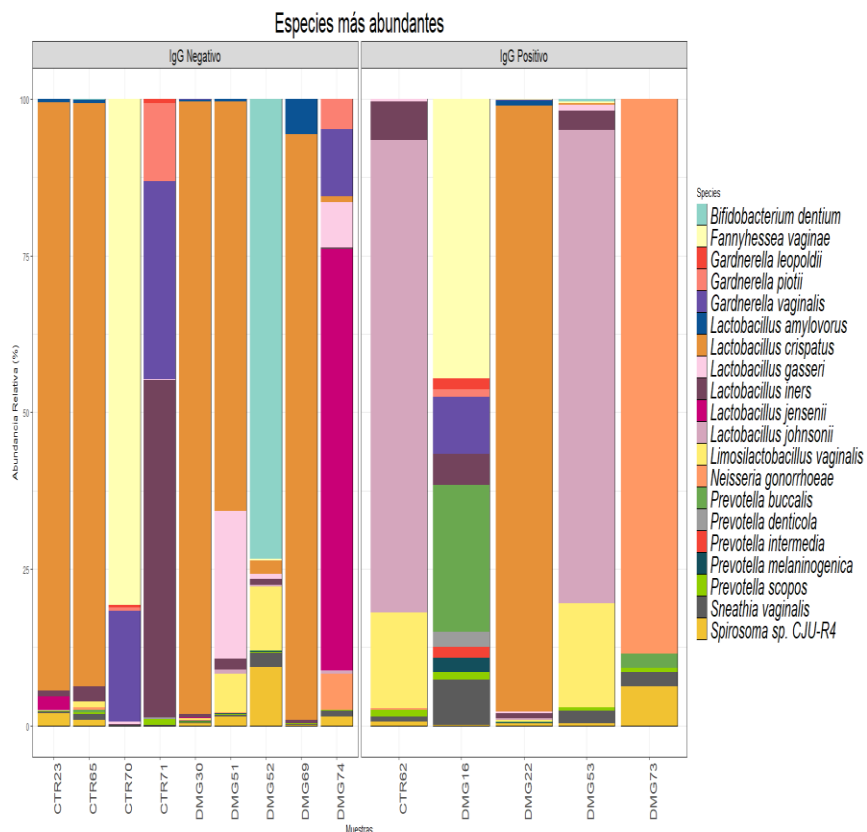


Figura 29. Composición taxonómica, los colores representan las 20 especies con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x.

Cuadro 24. Abundancia relativa de las 20 especies más abundantes.

| Especie | IgG Negativo | Especie | IgG Positivo |
|--------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|---------------------|
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | 45.28% | <i>Lactobacillus johnsonii</i> | 20.99% |
| <i>Fannyhessea vaginae</i> | 8.62% | <i>Lactobacillus crispatus</i> | 18.41% |
| <i>Lactobacillus jensenii</i> | 7.24% | <i>Fannyhessea vaginae</i> | 7.99% |
| <i>Bifidobacterium dentium</i> | 6.82% | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 7.66% |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> | 6.09% | <i>Limosilactobacillus vaginalis</i> | 4.48% |
| <i>Lactobacillus iners</i> | 6.01% | <i>Prevotella buccalis</i> | 4.38% |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | 3.22% | <i>Enterococcus faecalis</i> | 3.72% |
| <i>Gardnerella piotii</i> | 1.77% | <i>Lactobacillus iners</i> | 2.29% |
| <i>Limosilactobacillus vaginalis</i> | 1.66% | <i>Sneathia vaginalis</i> | 1.89% |
| <i>Spirosoma sp. CJU-R4</i> | 1.49% | <i>Lactobacillus taiwanensis</i> | 1.77% |
| <i>Lactobacillus amylovorus</i> | 0.78% | <i>Gardnerella vaginalis</i> | 1.62% |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 0.73% | <i>Escherichia coli</i> | 1.56% |
| <i>Lactobacillus paragasseri</i> | 0.68% | <i>Cutibacterium acnes</i> | 1.10% |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 0.66% | <i>Staphylococcus cohnii</i> | 1.04% |
| <i>Tritonibacter mobilis</i> | 0.66% | <i>Brevundimonas nasdae</i> | 0.76% |
| <i>Sneathia vaginalis</i> | 0.49% | <i>Klebsiella huaxiensis</i> | 0.74% |
| <i>Odoribacter splanchnicus</i> | 0.29% | <i>Spirosoma sp. CJU-R4</i> | 0.74% |
| <i>Brevundimonas nasdae</i> | 0.27% | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 0.73% |
| <i>Alphapapillomavirus</i> | 0.25% | <i>Ralstonia solanacearum</i> | 0.72% |
| <i>Limosilactobacillus reuteri</i> | 0.19% | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | 0.66% |

12.4. Diferencias en la Estructura Cervicovaginal de Acuerdo a su Índice de Masa Corporal

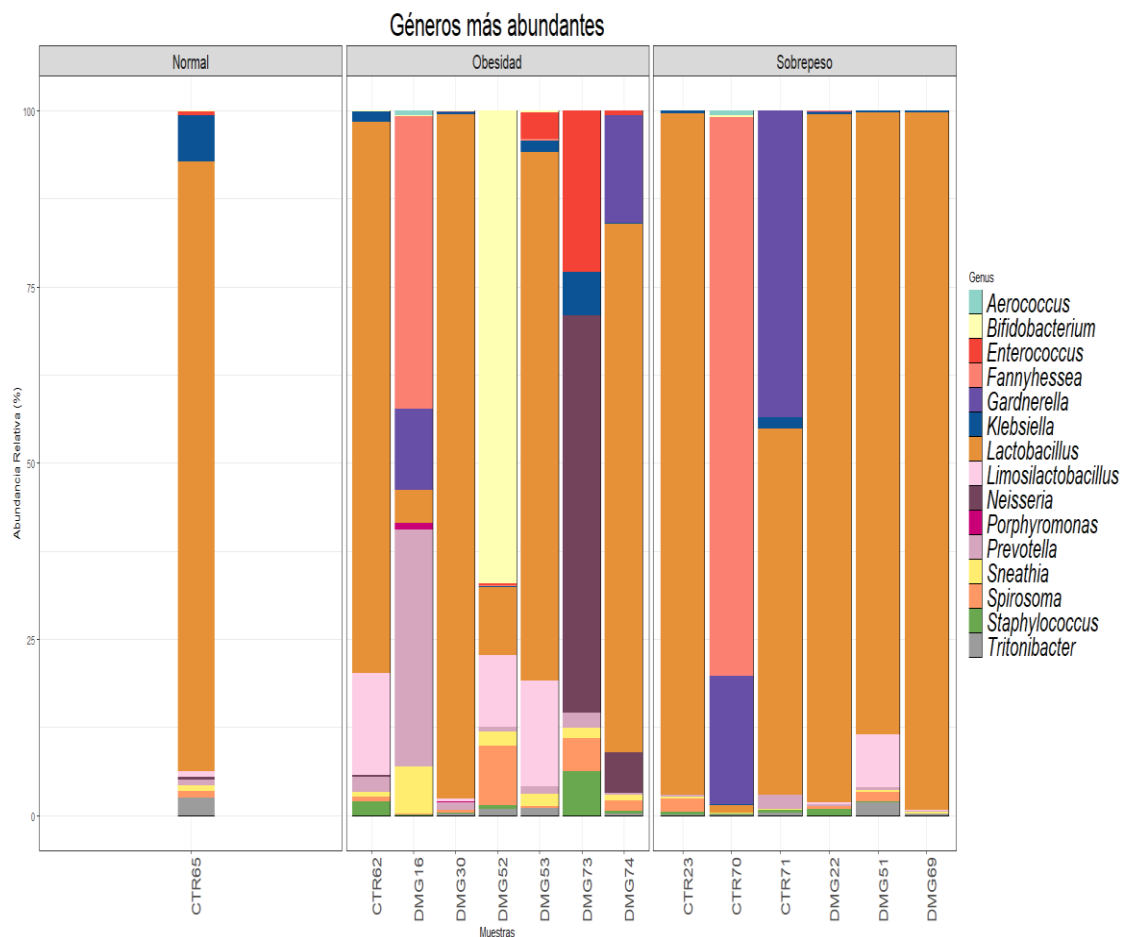


Figura 30. Composición taxonómica, los colores representan los 15 géneros con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x.

Cuadro 25. Abundancia relativa de los géneros más abundantes (IMC).

| Género | Normal | Género | Obesidad | Género | Sobrepeso |
|----------------------------|---------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|------------------|
| <i>Lactobacillus</i> | 75.12% | <i>Lactobacillus</i> | 43.52% | <i>Lactobacillus</i> | 70.07% |
| <i>Klebsiella</i> | 5.64% | <i>Bifidobacterium</i> | 8.98% | <i>Fannyhessea</i> | 12.93% |
| <i>Odoribacter</i> | 2.40% | <i>Neisseria</i> | 6.26% | <i>Gardnerella</i> | 9.74% |
| <i>Tritonibacter</i> | 2.16% | <i>Fannyhessea</i> | 5.71% | <i>Limosilactobacillus</i> | 1.23% |
| <i>Paenibacillus</i> | 1.08% | <i>Prevotella</i> | 5.40% | <i>Spirosoma</i> | 0.58% |
| <i>Ralstonia</i> | 0.96% | <i>Limosilactobacillus</i> | 4.87% | <i>Prevotella</i> | 0.50% |
| <i>Cetobacterium</i> | 0.96% | <i>Gardnerella</i> | 3.67% | <i>Klebsiella</i> | 0.43% |
| <i>Spirosoma</i> | 0.84% | <i>Enterococcus</i> | 2.78% | <i>Tritonibacter</i> | 0.41% |
| <i>Limosilactobacillus</i> | 0.72% | <i>Spirosoma</i> | 1.96% | <i>Brevundimonas</i> | 0.31% |
| <i>Sneathia</i> | 0.72% | <i>Sneathia</i> | 1.74% | <i>Staphylococcus</i> | 0.29% |
| <i>Achromobacter</i> | 0.72% | <i>Escherichia</i> | 1.19% | <i>Acinetobacter</i> | 0.28% |
| <i>Prevotella</i> | 0.60% | <i>Klebsiella</i> | 1.01% | <i>Sneathia</i> | 0.15% |
| <i>Pseudomonas</i> | 0.60% | <i>Staphylococcus</i> | 0.96% | <i>Papillomaviridae</i> | 0.12% |
| <i>Enterococcus</i> | 0.48% | <i>Cutibacterium</i> | 0.91% | <i>Aerococcus</i> | 0.11% |
| <i>Streptomyces</i> | 0.48% | <i>Bacillus</i> | 0.67% | <i>Lancefieldella</i> | 0.10% |

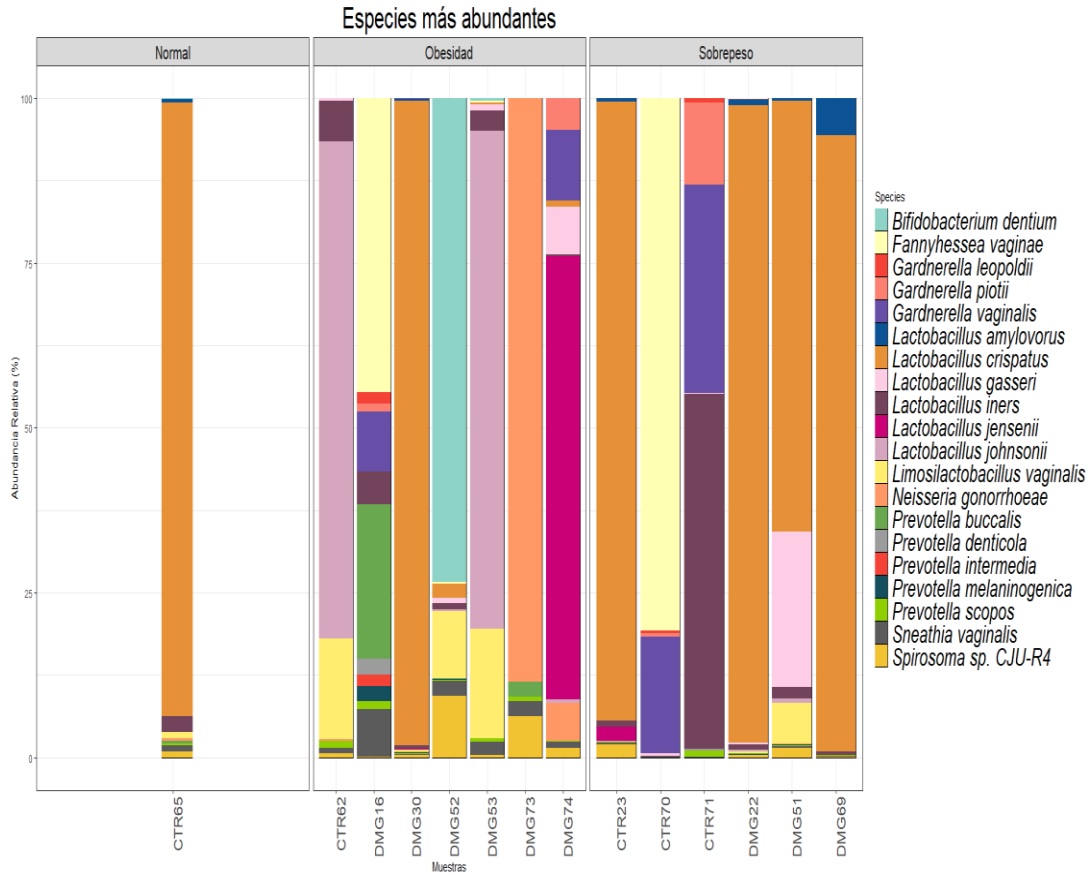


Figura 31. Composición taxonómica, los colores representan las 20 especies con mayor abundancia relativa (%). Las muestras se indican en el eje x.

Cuadro 26. Abundancia relativa de las 20 especies más abundantes (IMC).

| Especie | Normal | Especie | Obesidad | Especie | Sobrepeso |
|--------------------------------------|---------------|--------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|------------------|
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | 72.71% | <i>Lactobacillus johnsonii</i> | 15.06% | <i>Lactobacillus crispatus</i> | 55.18% |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 5.40% | <i>Lactobacillus crispatus</i> | 13.68% | <i>Fannyhessea vaginae</i> | 12.93% |
| <i>Odoribacter splanchnicus</i> | 2.40% | <i>Lactobacillus jensenii</i> | 9.01% | <i>Lactobacillus iners</i> | 8.59% |
| <i>Tritonibacter mobilis</i> | 2.16% | <i>Bifidobacterium dentium</i> | 8.79% | <i>Gardnerella vaginalis</i> | 7.47% |
| <i>Lactobacillus iners</i> | 1.92% | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 6.26% | <i>Lactobacillus gasseri</i> | 3.62% |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | 0.96% | <i>Fannyhessea vaginae</i> | 5.71% | <i>Gardnerella piotii</i> | 1.91% |
| <i>Cetobacterium somerae</i> | 0.96% | <i>Limosilactobacillus vaginalis</i> | 4.41% | <i>Lactobacillus amylovorus</i> | 1.19% |
| <i>Limosilactobacillus vaginalis</i> | 0.72% | <i>Prevotella buccalis</i> | 3.13% | <i>Limosilactobacillus vaginalis</i> | 0.97% |
| <i>Spirosoma sp. CJU-R4</i> | 0.72% | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2.74% | <i>Lactobacillus helveticus</i> | 0.58% |
| <i>Sneathia vaginalis</i> | 0.72% | <i>Gardnerella vaginalis</i> | 2.59% | <i>Spirosoma sp. CJU-R4</i> | 0.58% |
| <i>Paenibacillus sp. B01</i> | 0.72% | <i>Spirosoma sp. CJU-R4</i> | 1.84% | <i>Tritonibacter mobilis</i> | 0.41% |
| <i>Ureaplasma parvum</i> | 0.48% | <i>Sneathia vaginalis</i> | 1.74% | <i>Lactobacillus jensenii</i> | 0.34% |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 0.48% | <i>Lactobacillus iners</i> | 1.73% | <i>Brevundimonas nasdae</i> | 0.28% |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 0.36% | <i>Lactobacillus taiwanensis</i> | 1.26% | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 0.27% |
| <i>Lactobacillus amylovorus</i> | 0.36% | <i>Lactobacillus gasseri</i> | 1.20% | <i>Klebsiella huaxiensis</i> | 0.25% |
| <i>Achromobacter xylooxidans</i> | 0.36% | <i>Escherichia coli</i> | 1.19% | <i>Staphylococcus aureus</i> | 0.20% |
| <i>Desulfofarcimen acetoxidans</i> | 0.36% | <i>Cutibacterium acnes</i> | 0.91% | <i>Prevotella scopos</i> | 0.18% |
| <i>Paenibacillus sp. Cedars</i> | 0.36% | <i>Lactobacillus paragasseri</i> | 0.87% | <i>Gardnerella swidsinskii</i> | 0.17% |
| <i>Prevotella buccalis</i> | 0.24% | <i>Staphylococcus cohnii</i> | 0.79% | <i>Gardnerella leopoldii</i> | 0.17% |
| <i>Klebsiella huaxiensis</i> | 0.24% | <i>Gardnerella piotii</i> | 0.79% | <i>Prevotella enoeca</i> | 0.17% |

Debido a que se observa en pacientes con obesidad (IMC >30) una mayor abundancia de especies de *Lactobacillus* que no corresponden con la especie *Lactobacillus crispatus*, la cual se ha reportado como un indicador de una microbiota vaginal sana, se realizó una prueba t de student con base a las lecturas que se reportaron en el análisis de metagenomas completos. Al comparar el grupo de pacientes con obesidad y al grupo de pacientes con sobrepeso no se determinaron diferencias significativas.

Cuadro 27. Prueba t de student para las especies más abundantes dentro del grupo con obesidad y sobrepeso, para la normalización de los datos se realizó un test de Shapiro.

| Especie | Valor de P (Sobrepeso y obesidad) |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | P= 0.063 |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i> | P= 0.196 |
| <i>Fannyhessea vaginae</i> | P = 0.581 |
| <i>Lactobacillus iners</i> | P= 0.979 |
| <i>Lactobacillus jensenii</i> | P= 0.419 |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> | P= 0.835 |
| <i>Bifidobacterium dentium</i> | P= 0.377 |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | P= 0.478 |

12.5. Ejes 1:3 y 2:3 del Análisis UniFrac Ponderado y no Ponderado de las Secuencias ARNr
16S.

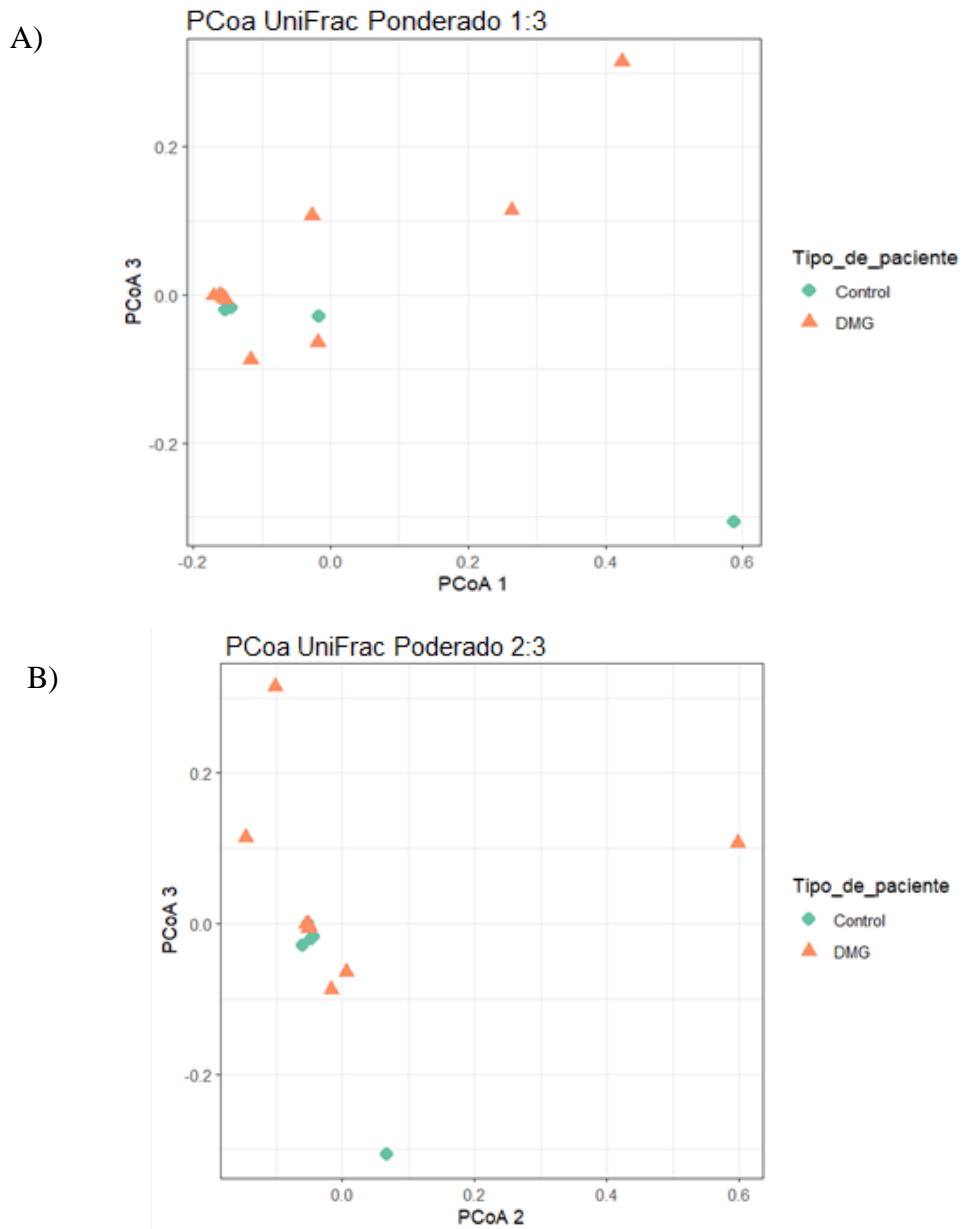


Figura 32. Diagrama PCoA-UniFrac ponderado, que muestra la separación de las muestras control (naranja) y DMG (verde). La figura A) muestra los ejes PCoA 1 y Pcoa 3. La figura B) muestra los ejes PCoA 2 y PCoA 3.

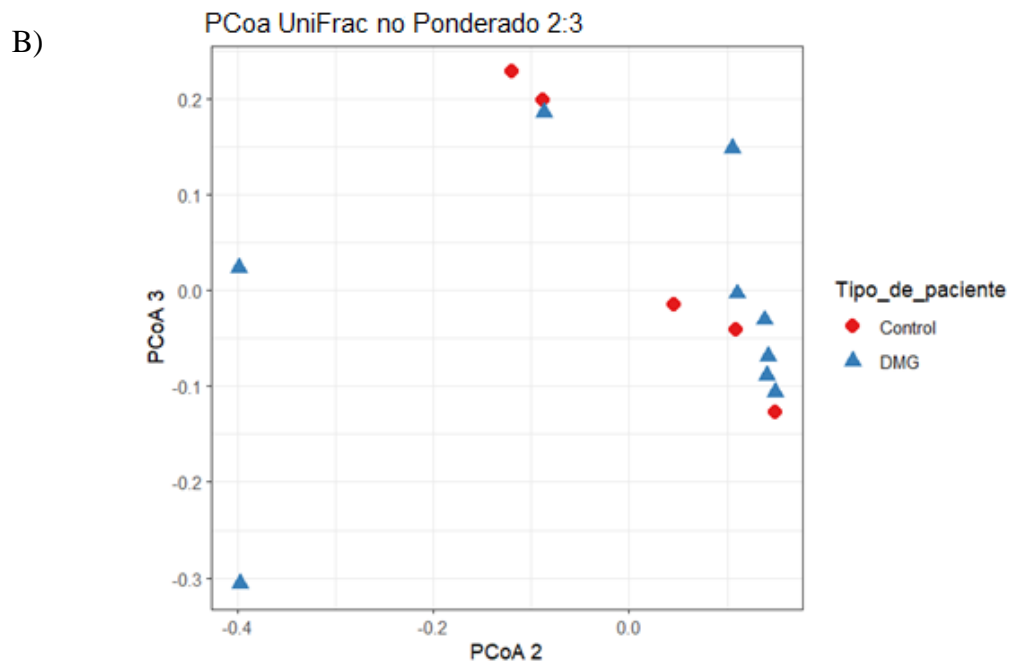
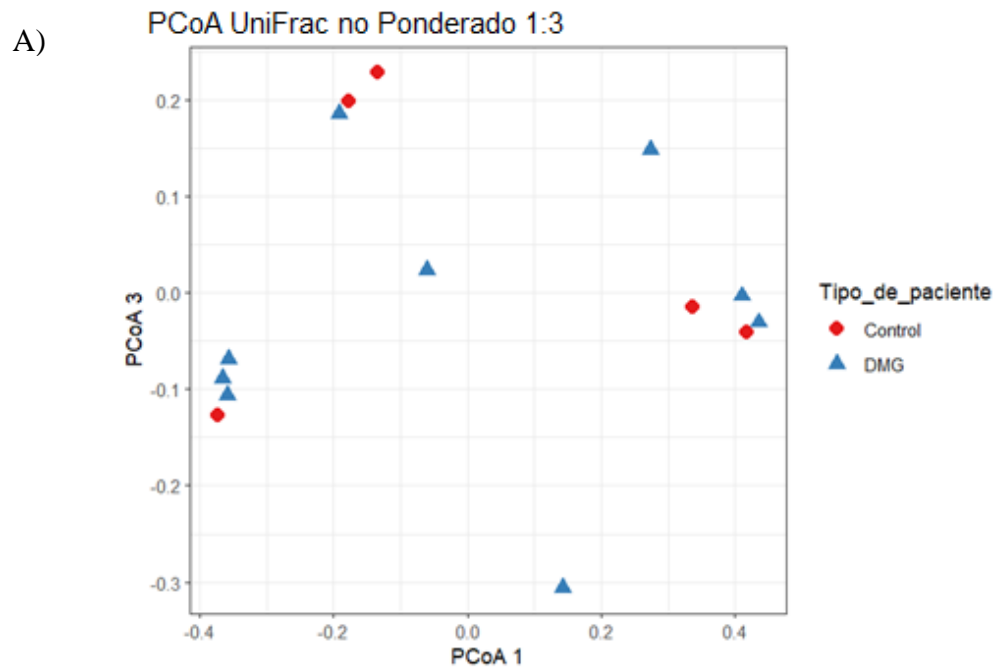


Figura 33. Diagrama PCoA-UniFrac no ponderado, que muestra la separación de las muestras control (rojo) y DMG (azul). La figura A) muestra los ejes PCoA 1 y PcoA 3. La figura B) muestra los ejes PCoA 2 y PCoA 3.

12.6. Ejes 1:3 y 2:3 del Diagrama de Cordenadas Bray Curtis de los Resultados Metagenómicos.

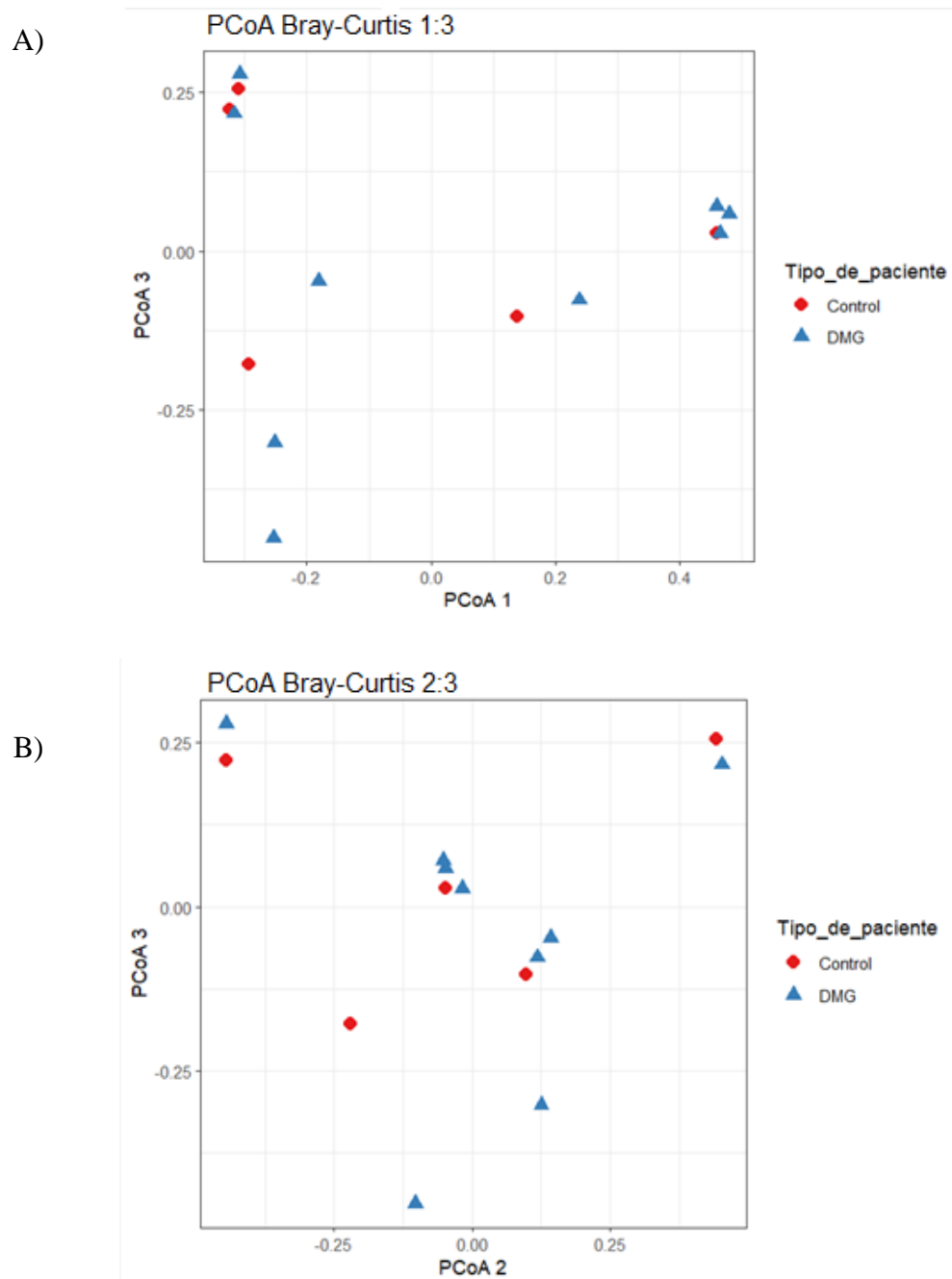


Figura 34. Diagrama PCoA Bray-Curtis, que muestra la separación de las muestras control (rojo) y DMG (azul). La figura A) muestra los ejes PCoA 1 y PcoA 3. La figura B) muestra los ejes PCoA 2 y PCoA 3.

12.7. Taxas Identificados en la Microbiota Vaginal de Pacientes con DMG (Secuenciación ARNr 16S).

Phylum

Firmicutes, Actinobacteriota, Bacteroidota, Proteobacteria, Fusobacteriota, Patescibacteria, Cyanobacteria, Synergistota.

Familia

Lactobacillaceae, Bifidobacteriaceae, Enterococcaceae, Prevotellaceae, Atopobiaceae, Veillonellaceae, Leptotrichiaceae, Corynebacteriaceae, Lachnospiraceae, Family XI, Hungateiclostridiaceae, Moraxellaceae, Sphingomonadaceae, Comamonadaceae, Clostridiaceae, Caulobacteraceae, Microbacteriaceae, Eggerthellaceae, Spirosomaceae, Mycoplasmataceae, Burkholderiaceae, Pseudomonadaceae, Streptococcaceae, Rhodobacteraceae, Alcaligenaceae, Alcanivoracaceae1, Aerococcaceae, Erysipelotrichaceae, Rikenellaceae, Ruminococcaceae, Succinivibrionaceae, Beijerinckiaceae, Propionibacteriaceae, Pasteurellaceae, Fusobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Erysipelatoclostridiaceae, Enterobacteriaceae, Exiguobacteraceae.

Género

Lactobacillus, Enterococcus, Bifidobacterium, Gardnerella, Prevotella, Atopobium, Sneathia, Megaspheera, Coriobacteriaceae UCG-002, HT002, Corynebacterium, Howardella, Parvimonas, Dialister, Fastidiosipila, Acinetobacter, Sphingomonas, Schlegelella, Clostridium sensu stricto 1, DNF00809, Microbacterium, Spirosoma, Ralstonia, Limosilactobacillus, Pseudomonas, Streptococcus, Mycoplasma, Achromobacter, Epibacterium, Alcanivorax, Caulobacter, Ureaplasma, Aerococcus, Ligilactobacillus, Bulleidia, Rikenellaceae RC9 gut group, Mageeibacillus, Faecalibacterium, Succinivibrio, 1174-901-12, Cutibacterium, Haemophilus, Fusobacterium, Subdoligranulum, Flavobacterium, Ruminococcus, Ezakiella, Enterobacter, Exiguobacterium, Catenibacterium.

Taxas identificados en la microbiota vaginal de pacientes control (Secuenciación ARNr 16S).

Phylum

Firmicutes, Actinobacteriota, Proteobacteria, Bacteroidota, Patescibacteria, Cyanobacteria, Synergistota, Bdellovibrionota, SAR324 clade (Grupo marino B).

Familia

Lactobacillaceae, Atopobiaceae, Bifidobacteriaceae, Veillonellaceae, Aerococcaceae, Spirosomaceae, Lachnospiraceae, Propionibacteriaceae, Beijerinckiaceae, Mycoplasmataceae, Corynebacteriaceae, Staphylococcaceae, Rhodobacteraceae, Prevotellaceae, Burkholderiaceae, Erwiniaceae, Micrococcaceae, Flavobacteriaceae, Family XI, Cyanobiaceae, Pseudomonadaceae, Sphingomonadaceae, LWQ8, Moraxellaceae, Bacillaceae, Microbacteriaceae, Hyphomicrobiaceae, Synergistaceae, Acetobacteraceae, Pseudonocardiaceae, Hungateiclostridiaceae, Comamonadaceae, Alteromonadaceae, Hydrogenophilaceae, Oscillospiraceae, Bdellovibrionaceae, Nitrosomonadaceae, Ilumatobacteraceae, Ruminococcaceae, Saprospiraceae.

Género

Lactobacillus, Atopobium, Gardnerella, Coriobacteriaceae UCG-002, HT002, Aerococcus, Bifidobacterium, Howardella, Spirosoma, Cutibacterium, Ureaplasma, 1174-901-12, Staphylococcus, Ralstonia, Corynebacterium, Methylobacterium-Methylorubrum, Limosilactobacillus, Flavobacterium, Prevotella_7, Paracoccus, Pseudomonas, Dialister, Lawsonella, Prevotella, Synechococcus CC9902, Pseudorhodobacter, Shuttleworthia, Microvirga, Acinetobacter, Terribacillus, Finegoldia, Hydrogenophilus, Hyphomicrobium, Roseomonas, Pseudonocardia, Fenollaria, Rheinheimera, Dyadobacter, Giesbergeria, Ezakiella, UCG-002, Bdellovibrio, Pyramidobacter, Ellin6067, Fretibacterium, CL500-29 marine group, Faecalibacterium, Lacihabitans, Anaeroglobus.

Anexo 6. Taxas identificados en la microbiota vaginal de pacientes con DMG (Secuenciación metagenómica).

Phylum

Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria, Shotokuvirae, Spirochaetes, Tenericutes, Armatimonadetes, Heunggongvirae, Euryarchaeota, Deinococcus-

Thermus, *Planctomycetes*, *Candidatus Saccharibacteria*, *Elusimicrobia*, *Candidatus Thermoplasmata*.

Familia

Lactobacillaceae, *Bifidobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Actinomycetaceae*, *Prevotellaceae*, *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Cytophagaceae*, *Leptotrichiaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Bacillaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Caulobacteraceae*, *Burkholderiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Zurhausenvirales*, *Alcaligenaceae*, *Clostridiaceae*, *Vibrionaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Moraxellaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Weeksellaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Streptomyces*, *Comamonadaceae*, *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Peptococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Oscillospiraceae*, *Roseobacteraceae*, *Erwiniaceae*, *Aerococcaceae*, *Marinobacteraceae*, *Bartonellaceae*, *Leptospiraceae*, *Bacteroidaceae*, *Planococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Mycobacteriaceae*, *Arcobacteraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Alteromonadaceae*, *Fimbriimonadaceae*, *Acetobacteraceae*, *Brachyspiraceae*, *Corynebacteriaceae*, *Cirivirales*, *Tissierellaceae*, *Halomonadaceae*, *Peptoniphilaceae*, *Pasteurellaceae*, *Autographiviridae*, *Odoribacteraceae*, *Blattabacteriaceae*, *Hydrogenophilaceae*, *Succinivibrionaceae*, *Maricaulaceae*, *Yersiniaceae*, *Paenibacillaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Pseudonocardaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Tannerellaceae*, *Eubacteriales Family XIII. Incertae Sedis*, *Aeromonadaceae*, *Nocardiosepsaceae*, *Micrococcaceae*, *Kofleriaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Acholeplasmataceae*, *Cardiobacteriaceae*, *Stellaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Helicobacteraceae*, *Rhodanobacteraceae*, *Chromobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Azonexaceae*, *Thermoanaerobacterales Family III, Incertae Sedis*, *Borreliaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Chitinophagaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Shewanellaceae*, *Legionellaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Kribbellaceae*, *Muribaculaceae*, *Anaplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Rikenellaceae*, *Dysgonomonadaceae*, *Deinococcaceae*, *Eggerthellaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Idiomarinaceae*, *Atopobiaceae*, *Dermabacteraceae*, *Candidatus Nanopelagicaceae*, *Hymenobacteraceae*, *Gemmataceae*, *Methanosarcinaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Ornithinimicrobiaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Listeriaceae*, *Selenomonadaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Campylobacteraceae*, *Natronaerobiaceae*, *Chromatiaceae*, *Desulfotomaculaceae*, *Cellvibrionaceae*, *Nocardiaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Desulfotobacteriaceae*, *Sporomusaceae*, *Fulvivirgaceae*, *Rhizobiaceae*,

Desulfovibrionaceae, Acidithiobacillaceae, Candidatus Nanosynbacteraceae, Treponemataceae, Endomicrobiaceae, Halorubraceae, Candidatus Methanomethylophilaceae, Spirosomaceae, Methanocaldococcaceae, Barnesiellaceae.

Género

Lactobacillus, Bifidobacterium, Neisseria, Fannyhessea, Prevotella, Limosilactobacillus, Gardnerella, Enterococcus, Spirosoma, Sneathia, Escherichia, Cutibacterium, Klebsiella, Staphylococcus, Brevundimonas, Bacillus, Tritonibacter, Ralstonia, Papillomaviridae, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Achromobacter, Clostridium, Acidaminococcus, Lactiplantibacillus, Xanthobacter, Vibrio, Streptomyces, Furfurilactobacillus, Empedobacter, Flavobacterium, Ottowia, Porphyromonas, Stutzerimonas, Salmonella, Streptococcus, Acinetobacter, Maribius, Moraxella, Desulfofarcimen, Marinobacter, Aerococcus, Bartonella, Leptospira, Buchnera, Psychrobacter, Photobacterium, Bacteroides, Mageibacillus, Chryseobacterium, Ureaplasma, Mycolicibacterium, Planococcus, Alteromonas, Ligilactobacillus, Fimbriimonas, Anaerostipes, Clostridioides, Roseomonas, Coprococcus, Priestia, Brachyspira, Mobiluncus, Corynebacterium, Circoviridae, Neobacillus, Dehalobacterium, Peribacillus, Poseidonibacter, Maculvirus, Halomonas, Eikenella, Schnuerera, Formosa, Faecalibacterium, Blattabacterium, Levilactobacillus, Pediococcus, Hydrogenophilus, Dialister, Megasphaera, Succinivibrio, Glycocalis, Kordia, Yersinia, Pasteurella, Desulfosarcina, Qiania, Shigella, Actinomyces, Cereibacter, Odoribacter, Grimontia, Parvimonas, Aminipila, Paenibacillus, Schaalia, Aeromonas, Cetobacterium, Blautia, Aliarcobacter, Polaribacter, Curvibacter, Lacinutrix, Nocardiosis, Rothia, Sporosarcina, Haliangium, Parabacteroides, Bacterioplanoides, Streptacidiphilus, Saccharopolyspora, Mariniplasma, Suttonella, Stella, Methanobacterium, Plesiomonas, Aerosticca, Deefgea, Butyricimonas, Cupriavidus, Paracoccus, Paraphotobacterium, Helicobacter, Ruminococcus, Parageobacillus, Delftia, Bordetella, Janthinobacterium, Ferribacterium, Haemophilus, Thermoanaerobacterium, Xanthomonas, Borrelia, Actinosynnema, Candidatus Endolissoclinum, Microvirga, Jeotgalicoccus, Dorea, Pantoea, Epilithonimonas, Mycetocola, Anaerococcus, Mycoplasma, Leptotrichia, Brevibacillus, Crassaminicella, Enterobacter, Acetoanaerobium, Mycobacterium, Flavihumibacter, Companilactobacillus, Lachnospira, Granulicatella, Phaeobacter, Bizionia, Cloacibacterium, Maribacter, Weissella, Burkholderia, Shewanella,

Legionella, *Mariniflexile*, *Ignavigranum*, *Lentilactobacillus*, *Kribbella*, *Spiroplasma*, *Alistipes*, *Peptoniphilus*, *Tannerella*, *Phocaeicola*, *Psychroserpens*, *Sphingomonas*, *Faecalicatena*, *Microbacterium*, *Rhodobaca*, *Petrimonas*, *Myroides*, *Deinococcus*, *Ehrlichia*, *Idiomarina*, *Sphingobacterium*, *Brachybacterium*, *Keratinibaculum*, *Sodaliphilus*, *Erysipelothrix*, *Candidatus Portiera*, *Finegoldia*, *Scardovia*, *Pseudoprevotella*, *Ilyobacter*, *Urbifossiella*, *Arabiibacter*, *Mycoplasmopsis*, *Methanosarcina*, *Mammaliococcus*, *Changpingibacter*, *Ornithinimicrobium*, *Parolsenella*, *Collinsella*, *Listeria*, *Paraprevotella*, *Hymenobacter*, *Campylobacter*, *Natranaerobius*, *Lachnoanaerobaculum*, *Trueperella*, *Candidatus Planktophila*, *Candidatus Nanopelagicus*, *Tetragenococcus*, *Cytobacillus*, *Terribacillus*, *Solibaculum*, *Roseburia*, *Simiaoa*, *Romboutsia*, *Desulfotomaculum*, *Veillonella*, *Muribaculum*, *Antarcticibacterium*, *Mucilaginibacter*, *Aggregatibacter*, *Cellvibrio*, *Rhodococcus*, *Capnocytophaga*, *Denitrobacterium*, *Niallia*, *Paraoerskovia*, *Atopobium*, *Vagococcus*, *Heyndrickxia*, *Caldalkalibacillus*, *Virgibacillus*, *Alkalihalobacillus*, *Solibacillus*, *Alicyclobacillus*, *Effusibacillus*, *Acutalibacter*, *Desulfitobacterium*, *Pectinatus*, *Megamonas*, *Pelosinus*, *Riemerella*, *Elizabethkingia*, *Rufibacter*, *Echinicola*, *Algoriphagus*, *Chryseolinea*, *Pedobacter*, *Arachidicoccus*, *Streptobacillus*, *Candidatus Doolittlea*, *Serratia*, *Erwinia*, *Nitrosococcus*, *Rhizobium*, *Wolbachia*, *Sphingobium*, *Wolinella*, *Arcobacter*, *Maridesulfovibrio*, *Acidithiobacillus*, *Candidatus Nanosynbacter*, *Treponema*, *Endomicrobium*, *Halorubrum*, *Candidatus Methanomethylophilus*, *Tenacibaculum*, *Dyadobacter*, *Profundibacter*, *Aquimarina*, *Erysipelatoclostridium*, *Rheinheimera*, *Methanocaldococcus*, *Miniphocaeibacter*, *Coprobacter*, *Fusobacterium*.

Species

Lactobacillus crispatus, *Lactobacillus jensenii*, *Bifidobacterium dentium*, *Lactobacillus johnsonii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Fannyhessea vaginae*, *Lactobacillus gasseri*, *Limosilactobacillus vaginalis*, *Prevotella buccalis*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Spirosoma* sp. CJU-R4, *Sneathia vaginalis*, *Lactobacillus iners*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus amylovorus*, *Cutibacterium acnés*, *Lactobacillus paragasseri*, *Gardnerella piotii*, *Brevundimonas nasdae*, *Staphylococcus cohnii*, *Tritonibacter mobilis*, *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus thuringiensis*, *Lactobacillus taiwanensis*, *Lactobacillus helveticus*, *Klebsiella huaxiensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Prevotella melaninogenica*, *Alphapapillomavirus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Prevotella*

scopos, *Limosilactobacillus reuteri*, *Prevotella denticola*, *Acidaminococcus fermentans*, *Prevotella intermedia*, *Gardnerella leopoldii*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Prevotella enoeca*, *Furfurilactobacillus rossiae*, *Staphylococcus aureus*, *Empedobacter falsenii*, *Vibrio sp. Scap24*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Prevotella jejuni*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Ottowia testudinis*, *Lactobacillus intestinalis*, *Stutzerimonas stutzeri*, *Salmonella entérica*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Achromobacter sp. MFA1 R4*, *Prevotella nigrescens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Prevotella copri*, *Porphyromonas somerae*, *Maribius sp. THAF1*, *Flavobacterium plurextorum*, *Moraxella osloensis*, *Desulfofarcimen acetoxidans*, *Staphylococcus arlettae*, *Bartonella krasnovii*, *Aerococcus christensenii*, *Leptospira santarosai*, *Buchnera aphidicola*, *Acinetobacter johnsonii*, *Photobacterium damsela*, *Bifidobacterium adolescentes*, *Prevotella veroralis*, *Mageeibacillus indolicus*, *Marinobacter sp. LQ44*, *Psychrobacter sp. P11F6*, *Limosilactobacillus frumenti*, *Pseudomonas sp. CIP-10*, *Spirosoma sp. KUDC1026*, *Gardnerella swidsinskii*, *Prevotella histicola*, *Streptomyces sp. ICC4*, *Prevotella sp. oral taxon 299*, *Ureaplasma urealyticum*, *Pseudomonas putida*, *Mycolicibacterium litorale*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alteromonas macleodii*, *Clostridium botulinum*, *Pseudomonas phenolilytica*, *Fimbriimonas ginsengisoli*, *Planococcus sp. MB-3u-03*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas chengduensis*, *Clostridioides difficile*, *Roseomonas mucosa*, *Coprococcus catus*, *Priestia megaterium*, *Brachyspira pilosicoli*, *Mobiluncus curtisii*, *Clostridium tetani*, *Circoviridae 2 LDMD-2013*, *Neobacillus drentensis*, *Prevotella multiformis*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Dehalobacterium formicoaceticum*, *Achromobacter sp. AONIH1*, *Klebsiella grimontii*, *Peribacillus frigoritolerans*, *Streptomyces sp. ICC1*, *Anaerostipes caccae*, *Pseudomonas oleovorans*, *Spirosoma radiotolerans*, *Poseidonibacter lekithochrous*, *Halomonas sp. JS92-SW72*, *Eikenella exigua*, *Schnuerera ultunensis*, *Formosa sp. L2A11*, *Streptomyces sp. NHF165*, *Streptococcus equi*, *Prevotella dentalis*, *Blattabacterium cuenoti*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Levilactobacillus brevis*, *Pediococcus acidilactici*, *Vibrio natriegens*, *Hydrogenophilus thermoluteolus*, *Maculvirus OWB*, *Dialister pneumosintes*, *Clostridium kluyveri*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Bacillus cereus*, *Glycocalis alkaliphilus*, *Prevotella oris*, *Bacteroides fragilis*, *Kordia antárctica*, *Enterococcus faecium*, *Desulfosarcina widdelii*, *Pseudomonas wenzhouensis*, *Corynebacterium urealyticum*, *Streptococcus thermophilus*, *Prevotella sp. Rep29*, *Qiania dongpingensis*, *Shigella flexneri*, *Cereibacter sphaeroides*, *Odoribacter splanchnicus*, *Pasteurella multocida*, *Bacillus subtilis*, *Grimontia hollisae*,

Clostridium cellulovorans, *Parvimonas micra*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Streptomyces harbinensis*, *Lactobacillus ultunensis*, *Prevotella* sp. oral taxon 475, *Bifidobacterium pullorum*, *Aminipila luticellarii*, *Bacillus safensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Clostridium butyricum*, *Aeromonas caviae*, *Prevotella fusca*, *Cetobacterium somerae*, *Streptococcus suis*, *Clostridium cadaveris*, *Polaribacter pectinis*, *Aliarcobacter cryaerophilus*, *Chryseobacterium* sp. Y16C, *Chryseobacterium indologenes*, *Marinobacter fonticola*, *Prevotella bryantii*, *Clostridium* sp. C1, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium novyi*, *Actinomyces viscosus*, *Curvibacter* sp. AEP1-3, *Lacinutrix* sp. WUR7, *Nocardiosis alba*, *Clostridium* sp. DL-VIII, *Sporosarcina* sp. P37, *Streptococcus anginosus*, *Rothia mucilaginosus*, *Haliangium ochraceum*, *Schaalia odontolytica*, *Limosilactobacillus mucosae*, *Bacterioplanoides* sp. SCSIO 12839, *Lactobacillus acetotolerans*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Streptacidiphilus bronchialis*, *Saccharopolyspora spinosa*, *Mariniplasma anaerobium*, *Suttonella* sp. R2A3, *Stella humosa*, *Methanobacterium* sp. MethCAN, *Plesiomonas shigelloides*, *Paenibacillus polymyxa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Megasphaera hexanoica*, *Bifidobacterium lemorum*, *Blautia obeum*, *Aerosticca soli*, *Psychrobacter arenosus*, *Deefgea* sp. D13, *Marinobacter* sp. M3C, *Paraphotobacterium marinum*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Yersinia frederiksenii*, *Helicobacter pylori*, *Parabacteroides distasonis*, *Ruminococcus champanellensis*, *Enterococcus lactis*, *Parageobacillus thermoglucosidasius*, *Cupriavidus pauculus*, *Delftia lacustris*, *Bordetella trematum*, *Janthinobacterium* sp. Marseille, *Ferribacterium limneticum*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Bifidobacterium longum*, *Prevotella* sp. E15-22, *Butyricimonas virosa*, *Chryseobacterium arthrosphaerae*, *Streptomyces ficellus*, *Borrelia miyamotoi*, *Megasphaera stantonii*, *Actinosynnema pretiosum*, *Anaerostipes hadrus*, *Lactobacillus* sp. CBA3606, *Lactobacillus kefiranofaciens* *Paracoccus liaowanqingii*, *Candidatus Endolissoclinum faulkneri*, *Bifidobacterium breve*, *Microvirga ossetica*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Ligilactobacillus ruminis*, *Jeotgalicoccus* sp. WY2, *Dorea longicatena*, *Thermoanaerobacterium* sp. RBITD, *Corynebacterium occultum*, *Pantoea vagans*, *Epilithonimonas vandammei*, *Streptomyces armeniacus*, *Mycetocola spongiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma* sp. E35C, *Brevibacillus laterosporus*, *Clostridium* sp. MD294, *Crassaminicella profunda*, *Flavobacterium indicum*, *Chryseobacterium carnipullorum*, *Enterobacter bugandensis*, *Vibrio alfacensis*, *Acidaminococcus intestini*, *Achromobacter spanius*, *Bacillus* sp. BD59S, *Acetoanaerobium sticklandii*, *Xanthomonas translucens*, *Mycobacterium* sp. DL440, *Flaviumibacter rivuli*,

Companilactobacillus alimentarius, *Lachnospira eligens*, *Granulicatella elegans*, *Prevotella* sp. E9-3, *Prevotella herbatica*, *Phaeobacter gallaeciensis*, *Clostridium* sp. CM027, *Clostridium intestinale*, *Bizionia* sp. M204, *Cloacibacterium caeni*, *Streptomyces* sp. BJ20, *Streptomyces angustmyceticus*, *Maribacter cobaltidurans*, *Weissella cibaria*, *Burkholderia dolosa*, *Shewanella* sp. MEBiC00475, *Legionella longbeachae*, *Mariniflexile* sp. TRM1-10, *Chryseobacterium shandongense*, *Ignavigranum ruoffiae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Lentilactobacillus hilgardii*, *Kribbella qitaiheensis*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Megasphaera massiliensis*, *Anaerococcus obesiensis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacillus velezensis*, *Tannerella forsythia*, *Streptococcus oralis*, *Clostridium bornimense*, *Prevotella ruminicola*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides heparinolyticus*, *Leptotrichia wadei*, *Streptococcus mitis*, *Bacteroides* sp. CBA7301, *Psychroserpens* sp. NJDZ02, *Pseudomonas mendocina*, *Faecalicatena* sp. Marseille-Q4148, *Microbacterium* sp. BH-3-3-3, *Rhodobaca barguzinensis*, *Maculvirus* VP93, *Petrimonas mucosa*, *Myroides odoratus*, *Clostridium beijerinckii*, *Klebsiella variicola*, *Deinococcus peraridilitoris*, *Klebsiella michiganensis*, *Actinomyces* sp. Z16, *Alistipes shahii*, *Paracoccus mutanoliticus*, *Schaalia* sp. ZJ405, *Bifidobacterium thermophilum*, *Brachybacterium* sp. P6-10-X1, *Corynebacterium atypicum*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Planococcus antarcticus*, *Peptoniphilus harei*, *Keratinibaculum paraultunense*, *Bacteroides zoogloeformans*, *Bacteroides stercoris*, *Phocaeicola salanitronis*, *Sodaliphilus pleomorphus*, *Butyricimonas faecalis*, *Erysipelothrix* sp. HDW6A, *Spiroplasma sabaudiense*, *Pseudomonas* sp. KNUC1026, *Candidatus Portiera aleyrodidarum*, *Sphingomonas rhizophila*, *Blautia massiliensis*, *Finegoldia magna*, *Streptococcus pyogenes*, *Scardovia inopinata*, *Megasphaera elsdenii*, *Pseudoprevotella muciniphila*, *Chryseobacterium gallinarum*, *Acinetobacter* sp. TTH0-4, *Leptotrichia* sp. oral taxon 221, *Ilyobacter polytropus*, *Pasteurella canis*, *Urbifossiella limnaea*, *Pseudomonas multiresinivorans*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Pseudomonas* sp. ATCC 13867, *Flavobacterium haoranii*, *Arabiibacter massiliensis*, *Lactobacillus panisapium*, *Mycoplasmopsis bovis*, *Idiomarina loihiensis*, *Sphingobacterium* sp. SRCM116780, *Methanosarcina barkeri*, *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Changpingibacter yushuensis*, *Bifidobacterium actinocoloniiforme*, *Ornithinimicrobium* sp. JY.X270, *Corynebacterium aurimucosum*, *Parolsenella catena*, *Staphylococcus hominis*, *Paenibacillus bovis*, *Anaerococcus mediterraneensis*, *Prevotella* sp. E13-17, *Paraprevotella xylaniphila*, *Bacteroides salyersiae*, *Hymenobacter qilianensis*, *Clostridium septicum*,

Xanthomonas campestris, *Natranaerobius thermophilus*, *Bacteroides helcogenes*, *Lachnoanaerobaculum umeaense*, *Actinomyces* sp. zg-332, *Trueperella pecoris*, *Bifidobacterium angulatum*, *Candidatus Planktophila vernalis*, *Candidatus Nanopelagicus limnes*, *Aerococcus urinaehominis*, *Tetragenococcus halophilus*, *Cytobacillus gottheilii*, *Terribacillus* sp. DMT04, *Paenibacillus brasiliensis*, *Faecalibacterium* sp. IP118, *Solibaculum mannosilyticum*, *Roseburia intestinalis*, *Simiaoa sunii*, *Romboutsia hominis*, *Desulfotomaculum nigrificans*, *Veillonella rodentium*, *Bacteroides coprosuis*, *Bacteroides nordii*, *Parabacteroides faecis*, *Muribaculum intestinale*, *Flavobacterium crocinum*, *Antarcticibacterium flavum*, *Mucilaginibacter rubeus*, *Aggregatibacter* sp. 2125159857, *Cellvibrio* sp. KY-GH-1, *Brevundimonas* sp. AJA228-03, *Neisseria arctica*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Actinomyces* sp. 432, *Peptoniphilus* sp. SAHP1, *Rhodococcus equi*, *Cupriavidus oxalaticus*, *Capnocytophaga sputigena*, *Denitrobacterium detoxificans*, *Niallia circulans*, *Paenibacillus antarcticus*, [*Haemophilus*] *ducreyi*, *Paraoerskovia marina*, *Atopobium* sp. oral taxon 416, *Collinsella aerofaciens*, *Collinsella* sp. zg1085, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus infantis*, *Vagococcus zengguangii*, *Bacillus pseudomycooides*, *Heyndrickxia oleronia*, *Caldalkalibacillus thermarum*, *Virgibacillus* sp. MSP4-1, *Alkalihalobacillus clausii*, *Mammaliicoccus vitulinus*, *Solibacillus* sp. R5-41, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Effusibacillus dendaii*, *Listeria grayi*, *Listeria weihenstephanensis*, *Acutalibacter muris*, *Clostridium fermenticellae*, *Clostridium taeniosporum*, *Clostridium carboxidivorans*, *Blautia liquoris*, *Anaerostipes rhamnosivorans*, *Desulfitobacterium dichloroeliminans*, *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*, *Dialister hominis*, *Pectinatus frisingensis*, *Megamonas hypermegale*, *Pelosinus fermentans*, *Spiroplasma endosymbiont of 'Nebria riversi'*, *Prevotella* sp. E13-3, *Porphyromonas crevioricanis*, *Bacteroides luhongzhouii*, *Bacteroides caccae*, *Phocaeicola dorei*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Alistipes onderdonkii*, *Flavobacterium* sp. xlx-214, *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium crassostreae*, *Riemerella anatipestifer*, *Elizabethkingia anophelis*, *Rufibacter* sp. DG15C, *Echinicola vietnamensis*, *Algoriphagus* sp. NBT04N3, *Chryseolinea soli*, *Sphingobacterium* sp. E70, *Pedobacter steynii*, *Arachidicoccus soli*, *Streptobacillus moniliformis*, *Candidatus Doolittlea endobia*, *Serratia inhibens*, *Candidatus Erwinia haradaeae*, *Acinetobacter lwoffii*, *Psychrobacter cryohalolentis*, *Idiomarina* sp. OT37-5b, *Nitrosococcus watsonii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Ehrlichia ruminantium*, *Wolbachia endosymbiont of Ctenocephalides felis wCfeJ*, *Sphingomonas xanthus*, *Sphingobium indicum*, *Campylobacter peloridis*, *Campylobacter concisus*, *Wolinella succinogenes*, *Arcobacter cloacae*,

Maridesulfovibrio hydrothermalis, *Acidithiobacillus caldus*, *Candidatus Nanosynbacter* sp. HMT-352, *Treponema peruense*, *Endomicrobium proavitum*, *Halorubrum lacusprofundi*, *Candidatus Methanomethylophilus alvus*, *Tenacibaculum maritimum*, *Achromobacter deleyi*, *Profundibacter amoris*, *Chryseobacterium* sp. PCH239, *Aquimarina* sp. BL5, *Spirosoma endbachense*, *Dyadobacter fermentans*, *Erysipelatoclostridium ramosum*, *Rheinheimera mangrovi*, *Flavobacterium endoglycinae*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Rothia* sp. ZJ932, *Streptomyces spectabilis*, *Miniphocaeibacter halophilus*, *Spiroplasma poulsonii*, *Coprobacter secundus*, *Fusobacterium necrophorum*.

Taxas identificados en la microbiota vaginal de pacientes control (Secuenciación metagenómica).

Phylum

Firmicutes, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Heunggongvirae*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Euryarchaeota*, *Deinococcus-Thermus*.

Familia

Lactobacillaceae, *Actinomycetaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Prevotellaceae*, *Cytophagaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Straboviridae*, *Caulobacteraceae*, *Staphylococcaceae*, *Odoribacteraceae*, *Moraxellaceae*, *Leptotrichiaceae*, *Burkholderiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Streptomycetaceae*, *Peptoniphilaceae*, *Alcaligenaceae*, *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Clostridiaceae*, *Leptospiraceae*, *Mycoplasmataceae*, *Peptococcaceae*, *Neisseriaceae*, *Aerococcaceae*, *Atopobiaceae*, *Enterococcaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Streptococcaceae*, *Chitinophagaceae*, *Pasteurellaceae*, *Herpesvirales*, *Lachnospiraceae*, *Planococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Eggerthellaceae*, *Rhodanobacteraceae*, *Bartonellaceae*, *Weeksellaceae*, *Roseobacteraceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Hyphomonadaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Oscillospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Spirosomaceae*, *Veillonellaceae*, *Halomonadaceae*, *Nocardioideaceae*, *Bacteroidaceae*, *Erwiniaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Anaplasmataceae*, *Coriobacteriaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Tissierellaceae*, *Tannerellaceae*, *Azonexaceae*, *Shewanellaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Nocardiaceae*, *Comamonadaceae*, *Chromatiaceae*, *Aeromonadaceae*, *Legionellaceae*, *Methanocaldococcaceae*, *Arcobacteraceae*, *Borreliaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Cellulomonadaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Blattabacteriaceae*,

Nocardiopsaceae, Oceanospirillaceae, Sphingobacteriaceae, Spiroplasmataceae, Deinococcaceae, Idiomarinaceae, Methanosarcinaceae, Natranaerobiaceae, Barnesiellaceae.

Género

Lactobacillus, Fannyhessea, Gardnerella, Limosilactobacillus, Klebsiella, Prevotella, Spirosoma, Tritonibacter, Pseudomonas, Tequatrovirus, Brevundimonas, Odoribacter, Staphylococcus, Lactiplantibacillus, Acinetobacter, Sneathia, Ralstonia, Streptomyces, Achromobacter, Bacillus, Paenibacillus, Flavobacterium, Parvimonas, Weissella, Cetobacterium, Vibrio, Clostridium, Leptospira, Desulfofarcimen, Ureaplasma, Aerococcus, Lancefieldella, Neisseria, Escherichia, Enterococcus, Levilactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus, Pasteurella, Herpesviridae, Stenotrophomonas, Planococcus, Rothia Corynebacterium, Pediococcus, Furfurilactobacillus, Stutzerimonas, Ligilactobacillus, Actinomyces, Blautia, Luteibacter, Bartonella, Salmonella, Chryseobacterium, Maribius, Mammaliicoccus, Tenacibaculum, Eggerthella, Hyphomicrobium, Hyphomonas, Lacibacter, Finegoldia, Desulfosarcina, Cutibacterium, Dyadobacter, Acetoanaerobium, Mageeibacillus, Halomonas, Nocardioides, Bacteroides, Burkholderia, Buchnera, Eikenella, Mycobacterium, Flavihumibacter, Ehrlichia, Profundibacter, Xanthomonas, Coriobacterium, Peptoniphilus, Jeotgalibaca, Schnuerera, Ferribacterium, Shewanella, Tannerella, Myroides, Aquimarina, Dialister, Rhodococcus, Mobiluncus, Erysipelatoclostridium, Moraxella, Curvibacter, Loigolactobacillus, Megasphaera, Rheinheimera, Schaalia, Aeromonas, Bizionia, Legionella, Methanocaldococcus, Aliarcobacter, Arabiibacter, Cupriavidus, Borrelia, Porphyrobacter, Ruminococcus, Cloacibacterium, Erysipelothrix, Lachnoanaerobaculum, Cellulomonas, Halopseudomonas, Xanthobacter, Clostridioides. Peribacillus, Formosa, Blattabacterium, Lacinutrix, Nocardiosis, Bacterioplanoides, Lachnospira, Mariniflexile, Capnocytophaga, Denitrobacterium, Haemophilus, Companilactobacillus, Ignavigranum, Lentilactobacillus, Spiroplasma, Deinococcus, Idiomarina, Sphingobacterium, Mycoplasmopsis, Methanosarcina, Natranaerobius, Niallia, Miniphocaeibacter, Coprobacter, Fusobacterium

Especies

Lactobacillus crispatus, Fannyhessea vaginae, Lactobacillus iners, Lactobacillus johnsonii, Gardnerella vaginalis, Gardnerella piotii, Limosilactobacillus vaginalis, Klebsiella pneumoniae, Lactobacillus taiwanensis, Spirosoma sp. CJU-R4, Tritonibacter mobilis, Tequatrovirus kaw,

Odoribacter splanchnicus, *Lactobacillus jensenii*, *Klebsiella huaxiensis*, *Brevundimonas nasdae*, *Prevotella enoeca*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Prevotella scopos*, *Sneathia vaginalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Ralstonia solanacearum*, *Staphylococcus cohnii*, *Lactobacillus paragasseri*, *Gardnerella swidsinskii*, *Parvimonas micra*, *Weissella cibaria*, *Gardnerella leopoldii*, *Cetobacterium somerae*, *Pseudomonas sihuiensis*, *Lactobacillus amylovorus*, *Bacillus thuringiensis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Lactobacillus gasseri*, *Leptospira santarosai*, *Lactobacillus acidophilus*, *Desulfofarcimen acetoxidans*, *Ureaplasma parvum*, *Flavobacterium plurextorum*, *Staphylococcus aureus*, *Paenibacillus* sp. B01, *Aerococcus christensenii*, *Lactobacillus intestinalis*, *Lancefieldella parvula*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Streptomyces* sp. ICC1, *Neisseria gonorrhoeae*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Escherichia coli*, *Streptomyces armeniacus*, *Enterococcus faecium*, *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus frumenti*, *Pasteurella multocida*, *Paenibacillus* sp. Cedars, *Roseolovirus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Prevotella denticola*, *Planococcus* sp. MB-3u-03, *Streptomyces* sp. ICC4, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Pseudomonas multiresinivorans*, *Pediococcus acidilactici*, *Rothia mucilaginoso*, *Furfurilactobacillus rossiae*, *Stutzerimonas stutzeri*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Blautia massiliensis*, *Ligilactobacillus saerimneri*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas toyotomiensis*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Luteibacter rhizovicinus*, *Bartonella krasnovii*, *Achromobacter* sp. AONIH1, *Pseudomonas* sp. CIP-10, *Salmonella entérica*, *Brevundimonas albigilva*, *Prevotella buccalis*, *Maribius* sp. THAF1, *Mammaliicoccus sciuri*, *Tenacibaculum maritimum*, *Eggerthella lenta*, *Hyphomicrobium* sp. MCI, *Brevundimonas* sp. GW460-12-10-14-LB2, *Hyphomonas* sp. KY3, *Lacibacter* sp. S13-6-6, *Finegoldia magna*, *Desulfosarcina widdelii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Achromobacter spanius*, *Cutibacterium acnés*, *Lactobacillus helveticus*, *Achromobacter deleyi*, *Bacillus* sp. BD59S, *Acetoanaerobium sticklandii*, *Clostridium cellulovorans*, *Mageeibacillus indolicus*, *Bifidobacterium breve*, *Spirosoma* sp. KUDC1026, *Halomonas* sp. JS92-SW72, *Nocardioides* sp. dk884, *Acinetobacter schindleri*, *Burkholderia dolosa*, *Bacillus wiedmannii*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas* sp. phDVI, *Buchnera aphidicola*, *Eikenella exigua*, *Clostridium novyi*, *Actinomyces viscosus*, *Bifidobacterium longum*, *Mycobacterium* sp. DL440, *Flaviumibacter rivuli*, *Streptococcus pyogenes*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Bacteroides helcogenes*, *Actinomyces* sp. 432, *Profundibacter amoris*, *Chryseobacterium* sp. PCH239, *Achromobacter* sp. MFA1 R4, *Coriobacterium glomerans*, *Prevotella copri*, *Streptococcus anginosus*, *Peptoniphilus* sp. SAHP1,

Streptococcus intermedius, *Jeotgalibaca ciconiae*, *Xanthomonas albilineans*, *Bifidobacterium dentium*, *Pseudomonas putida*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas oleovorans*, *Schnuerera ultunensis*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Ferribacterium limneticum*, *Shewanella* sp. MEBiC00475, *Tannerella forsythia*, *Myroides odoratus*, *Pseudomonas* sp. ATCC 13867, *Clostridium septicum*, *Aquimarina* sp. BL5, *Spirosoma endbachense*, *Dyadobacter fermentans*, *Dialister pneumosintes*, *Mobiluncus curtisii*, *Klebsiella grimontii*, *Chryseobacterium arthrosphaerae*, *Flavobacterium haoranii*, *Clostridium* sp. CM027, *Erysipelatoclostridium ramosum*, *Streptomyces cavourensis*, *Moraxella osloensis*, *Lactobacillus ultunensis*, *Curvibacter* sp. AEP1-3, *Clostridium intestinale*, *Rhodococcus equi*, *Brevundimonas* sp. PAMC22021, *Flavobacterium cerinum*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Megasphaera hexanoica*, *Rheinheimera mangrovi*, *Dyadobacter* sp. CY399, *Clostridium kluyveri*, *Aeromonas caviae*, *Bizionia* sp. M204, *Legionella longbeachae*, *Schaalia* sp. ZJ405, *Flavobacterium endoglycinae*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Arabiibacter massiliensis*, *Aliarcobacter skirrowii*, *Cupriavidus oxalaticus*, *Staphylococcus arlettae*, *Pseudomonas wenzhouensis*, *Porphyrobacter* sp. CACIAM 03H1, *Borrelia crocidurae*, *Clostridium beijerinckii*, *Lactobacillus panisapium*, *Ruminococcus champanellensis*, *Cloacibacterium caeni*, *Lachnoanaerobaculum umeaense*, *Cellulomonas* sp. H30R-01, *Rhodococcus jostii*, *Erysipelothrix* sp. Poltava, *Halopseudomonas salegens*, *Vibrio europaeus*, *Vibrio japonicus*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Clostridioides difficile*, *Peribacillus frigoritolerans*, *Formosa* sp. L2A11, *Streptomyces* sp. NHF165, *Blattabacterium cuenoti*, *Prevotella oris*, *Lacinutrix* sp. WUR7, *Nocardiosis alba*, *Bacterioplanoides* sp. SCSIO 12839, *Lactobacillus acetotolerans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Lachnospira eligens*, *Streptomyces* sp. BJ20, *Mariniflexile* sp. TRM1-10, *Chryseobacterium shandongense*, *Klebsiella variicola*, *Xanthomonas campestris*, *Capnocytophaga sputigena*, *Denitrobacterium detoxificans*, *Rothia* sp. ZJ932, *Clostridium botulinum*, *Clostridium* sp. DL-VIII, *Companilactobacillus alimentarius*, *Ignavigranum ruoffiae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Lentilactobacillus hilgardii*, *Deinococcus peraridilitoris*, *Klebsiella michiganensis*, *Mycoplasmopsis bovis*, *Idiomarina loihiensis*, *Sphingobacterium* sp. SRCM116780, *Methanosarcina barkeri*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Natranaerobius thermophilus*, *Niallia circulans*, *Paenibacillus antarcticus*, [*Haemophilus*] *ducreyi*, *Streptomyces spectabilis*, *Miniphocaeibacter halophilus*, *Spiroplasma poulsonii*, *Coprobacter secundus*, *Fusobacterium necrophorum*.