

**Cinvestav**

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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Estudio metagenómico de la microbiota del  
tracto reproductivo durante el desarrollo de  
cáncer cervicouterino”**

Tesis que presenta

**Q.B.P. CRISTINA VELÁZQUEZ MARTÍNEZ**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

En la especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Director de Tesis

**Dr. Jaime García Mena**

Asesores

**Dr. Patricio Gariglio Vidal**

**Dr. José De La Luz Díaz Chávez**

MÉXICO, DF.

Agosto, 2015.

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



Se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia técnica con los reactivos y al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con el material del laboratorio.

Para la realización de este trabajo se recibió apoyo del CINVESTAV, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) PNPC 2014 y CONACyT 163235 INFR-2011-01.

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento al CINVESTAV por el apoyo otorgado durante el desarrollo de este proyecto.

Un agradecimiento a todas las personas involucradas en la realización de este proyecto:

Al director de este trabajo, Dr. Jaime García Mena por la supervisión, orientación y apoyo brindado durante este tiempo.

A mi comité tutorial, Dr. Patricio Gariglio Vidal y Dr. José De La Luz Díaz Chávez por la disponibilidad y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

Al personal del laboratorio de Oncología Molecular, particularmente al auxiliar de investigación Dr. Rodolfo Ocadiz Delgado por todo el apoyo y las facilidades brindadas para la culminación de este proyecto.

Al Dr. Selvasankar Murugesan, personal del Laboratorio de Referencia y Apoyo Para la Caracterización de Genomas Transcriptomas y Microbiomas, por su conocimiento, paciencia y apoyo.

Al personal administrativo del Departamento de Genética y Biología Molecular, en especial a Gabriela Mora Macias por su destacada labor como secretaria de la coordinación académica.

A todos ellos: ¡Muchas gracias!

## ÍNDICE

	Página
Índice de tablas.	ii
Índice de figuras.	iii
Notación.	iv
Resumen.	V
Abstract.	vi
I. Introducción.	1
I.1 La pérdida de control del ciclo celular como causa del cáncer.	1
I.2 El cáncer cervicouterino.	2
I.2.1 El virus del papiloma humano.	5
I.2.2 Agentes químicos carcinógenos.	7
I.2.3 Factores hormonales.	8
I.2.4 Factores genéticos.	9
I.2.5 La microbiota y su asociación con cáncer.	10
I.2.5.1 Microbiota del tracto reproductivo femenino y disbiosis.	12
II. Antecedentes.	16
II.1 Ratón transgénico K14HPV16E7	19
III. Justificación.	20
IV. Hipótesis.	20
V. Objetivos.	21
VI. Alcance.	22
VII. Metodología.	23
VII.1 Plan de trabajo.	23
VII.2 Diseño experimental y métodos.	24
VII.2.1 Inducción de cáncer cervicouterino en el modelo de ratón transgénico.	24
VII.2.2 Obtención de tejido y tratamiento.	24
VII.2.3 Detección del transgén de HPV16 E6/E7.	25
VII.2.4 Obtención de muestras de tracto reproductivo y copro de ratones.	25
VII.2.5 Extracción y purificación de DNA.	26
VII.2.6 Amplificación de región V3 de rDNA 16S.	26
VII.2.7 Estudio metagenómico de la diversidad bacteriana.	31
VII.2.8 Análisis de resultados.	33
VIII. Resultados.	34
IX. Discusión.	56
X. Conclusiones.	64
XI. Referencias.	65
XII. Anexos	70

**INDICE DE TABLAS**

		Página
Tabla 1	Iniciadores y condiciones empleadas para la detección del transgén E6/E7.	25
Tabla 2	Iniciadores y condiciones empleadas para la amplificación de las regiones polimórficas V3-V4 del gen rDNA 16S.	27
Tabla 3	Iniciadores y condiciones empleadas para la amplificación del gen rDNA 16S.	29
Tabla 4	Iniciadores con “barcodes” utilizados para la preparación de genotecas de la región polimórfica V3 del gen rDNA 16S.	30
Tabla 5	Iniciadores y condiciones empleadas para la amplificación de la región polimórfica V3 del gen rDNA 16S insertando “barcodes”.	30
Tabla 6	Concentraciones de DNA en muestras de lavado vaginal y copro de ratones.	36
Tabla 7	Volúmenes utilizados de cada genoteca de lavado vaginal para preparar el “pool” para secuenciación masiva.	41
Tabla 8	Volúmenes utilizados de cada genoteca de copro para preparar el “pool” para secuenciación masiva.	42
Tabla 9	Concentración de DNA en genotecas de lavado vaginal y copro.	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Fases del ciclo celular.	1
Figura 2	Histología de los diferentes grados de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).	4
Figura 3	Expresión de HPV16E7 en ratón transgénico.	19
Figura 4	Diagrama general de trabajo.	23
Figura 5	Regiones polimórficas de del gen rRNA 16S de <i>Escherichia coli</i> K-12.	27
Figura 6	Detección del transgén de E6-E7 por PCR.	34
Figura 7	Cortes de cérvix de ratones transgénicos y no transgénicos con siete meses de edad.	35
Figura 8	Fraccionamiento electroforético de ácidos nucleicos.	37
Figura 9	Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando iniciadores FBac – CGO 605R.	38
Figura 10	Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando iniciadores CGO 465, PCR anidada.	38
Figura 11	Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando iniciadores CGO 465.	39
Figura 12	Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando iniciadores V3 341F – V3 518R.	40
Figura 13	Preparación de genotecas V3 de rDNA 16S.	43
Figura 14	Parámetros de diversidad alfa calculados a partir de la tabla de OTUs de las muestras de lavado vaginal, agrupadas por tratamiento.	45
Figura 15	Abundancia relativa de microorganismos a nivel de filum en las muestras de lavado vaginal.	46
Figura 16	Abundancia relativa de microorganismos a nivel de género en las muestras de lavado vaginal.	47
Figura 17	Gráfico de análisis de coordinados principales (PCoA) de las muestras de lavado agrupadas por tratamiento.	48
Figura 18	Abundancia relativa de microorganismos identificados a nivel de filum a un mes, tres meses y seis meses de tratamiento.	49
Figura 19	Abundancia relativa de microorganismos identificados a nivel de género a un mes, tres meses y seis meses de tratamiento.	50
Figura 20	Parámetros de diversidad alfa calculados a partir de la tabla de OTUs de las muestras de copro, agrupadas por tratamiento.	52
Figura 21	Abundancia relativa de microorganismos a nivel de filum en las muestras de copro.	53
Figura 22	Abundancia relativa de microorganismos a nivel de género en las muestras de copro.	54
Figura 23	Gráfico de análisis de coordinados principales (PCoA) de las muestras de copro agrupadas por tratamiento.	55

## NOTACIÓN

CaCu	Cáncer cervicouterino.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
INEGI	Instituto Nacional de Geografía y Estadística.
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical.
LSIL	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado.
HSIL	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado.
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.
pRB	Retinoblastoma.
VPH	Virus de Papiloma Humano.
ITS	Infección de Transmisión Sexual.
IARC	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer.
HLA	Antígeno Leucocitario Humano.
CRC	Cáncer colorectal.
GST	Glutación-S-transferasa
OSCC	Carcinoma de células cancerosas orales.
HMP	Proyecto del Microbioma Humano.
BAL	Bacteria Acido Láctica.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno.
VB	Vaginosis Bacteriana.
VA	Vaginitis Aerobia.
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido.
Barcodes	Secuencias de nucleótidos únicas para marcar cada muestra de DNA.
NCI	Instituto Nacional del Cáncer.
QIIME	Conocimientos Cuantitativos en la Ecología Microbiana.
OTU	Unidad Taxonómica Operacional



## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud mundial. En México en el 2013, se registraron 3,784 muertes por tumores de cuello uterino y el virus del papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico. A pesar de la alta incidencia de la infección con VPH de alto riesgo, un bajo porcentaje de infecciones progresa a CaCu. Se sabe que el uso de anticonceptivos hormonales durante largos periodos de tiempo es un factor asociado al desarrollo de CaCu. Interesantemente, la Vaginosis Bacteriana (VB) se ha asociado con susceptibilidad a infecciones de transmisión sexual como VPH y VIH. Gillet y colaboradores en 2012, observaron una asociación entre la presencia de VB y el desarrollo de Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NICs), sugiriendo que la microbiota puede ser un factor relacionado con el desarrollo de NICs y un factor de riesgo en el desarrollo de CaCu. El objetivo de este proyecto fue Investigar si existe disbiosis del tracto reproductivo de ratones hembra K14E7 durante el proceso de carcinogénesis inducida por tratamiento con 17  $\beta$ -estradiol. Se obtuvieron muestras de lavado vaginal y de copro de ratones hembra controles no transgénicos (FVB) y transgénicos (K14E7), a los que se les aplicó o no tratamiento con 17  $\beta$ -estradiol. Se prepararon las genotecas de la región V3 del rDNA 16S por PCR. Se llevó a cabo la secuenciación masiva semiconductora de iones y los datos se analizaron utilizando el programa QIIME. Encontramos una diferencia significativa entre las medias de microorganismos del filum Firmicutes del grupo E7(+E2) y el grupo FVB(+E2). En el género *Gemella* sp. se observó que los grupos FVB(-E2), E7(-E2) y E7(+E2) son diferentes. En el género *Proteus* sp. los grupos FVB(+E2) FVB(-E2) y E7(+E2) son diferentes. No se observaron cambios en la microbiota intestinal de ratones que desarrollan CaCu. Varias especies de los géneros identificados se han referido en muestras de pacientes que presentan cuadros inflamatorios, cáncer colorectal, carcinoma de células orales o cáncer de próstata, sugiriendo su posible papel en el proceso inflamatorio, uno de los procesos de la carcinogénesis. En este trabajo, se caracterizó la microbiota del modelo de estudio de ratón HPV16K14E7 que es el modelo *in vivo* de elección para el estudio de CaCu, contribuyendo en la comprensión global del modelo de estudio. Observamos cambios en la diversidad microbiana del tracto reproductivo de ratones transgénicos K14E7 que desarrollan condicionalmente CaCu, particularmente en el filum Firmicutes del género *Gemella* sp.

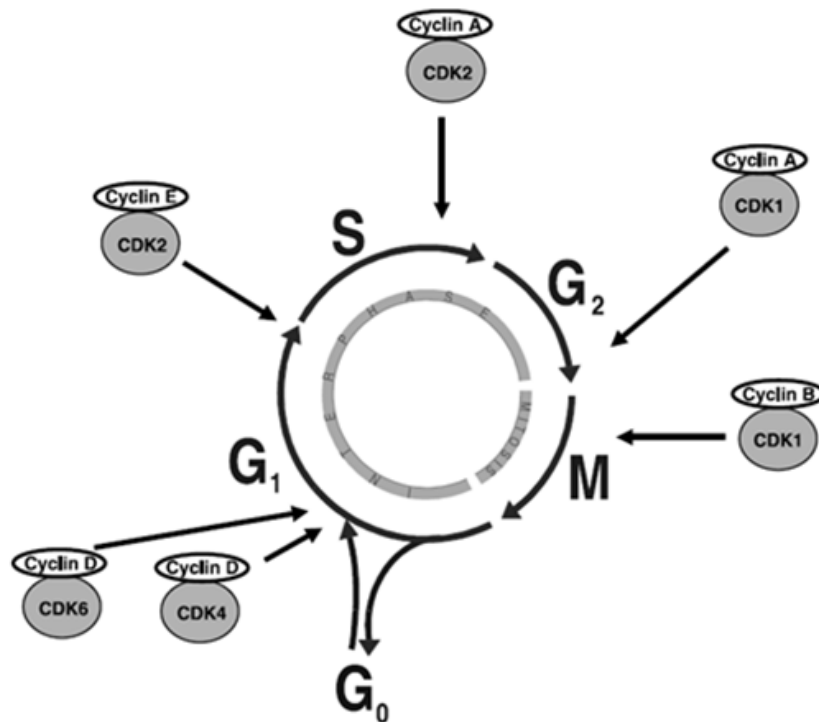
## ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is a global health issue. In 2013, 3,784 deaths were attributed to cervical tumors in Mexico, being the human papillomavirus (HPV) the main etiological agent. Despite the high incidence of infection with high-risk HPV, only a small percentage of infections progress to CC. It is known that the use of hormonal contraceptives for long periods of time is a factor associated with the development of CC. Interestingly; Bacterial Vaginosis (BV) has been associated with susceptibility to sexually transmitted infections such as HPV and HIV. Gillet and colleagues in 2012, found an association between the presence of VB and the development of cervical intraepithelial neoplasia (NICs) that can progress to cancer, suggesting the microbiota may be a factor related to the development of NICs and a risk factor the development of CC. The aim of this project was to investigate if there is dysbiosis on reproductive tract of the K14E7 female mice during carcinogenesis induced by treatment with estradiol. Samples of vaginal washing and feces from non transgenic (FVB) and transgenic (K14E7) female mice, with or without treatment were obtained. Total DNA was extracted and libraries of the V3 region of 16S rDNA were prepared by PCR. Ion semiconductor sequencing was performed and data were analyzed using QIIME. We found a significant difference between the means of microorganisms of the phylum Firmicutes in the E7(+E2) and FVB(+E2) groups. In the genus *Gemella* sp. groups FVB(-E2), E7(-E2) and E7(+E2) were different. In the genus *Proteus* sp. Groups FVB(+E2), FVB(-E2) and E7(+E2) were different. No changes were observed in the intestinal microbiota of mice that develop cervical cancer. Several species of these genera have been identified in samples derived from patients with inflammatory conditions or cancerous processes as colorectal cancer, oral carcinoma or prostate cancer, suggesting its possible role in the inflammatory process, now recognized as one of the hallmarks of cancer. In this work was characterized the microbiota of the HPV16K14E7 mouse model, the in vivo study model of choice for CC contributing to the overall understanding of the study model. We observed changes in microbial diversity of the reproductive tract of transgenic mice that develop conditionally CC, particularly in the phylum Firmicutes genus *Gemella* sp.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1 La pérdida de control del ciclo celular como causa del cáncer.

El ciclo celular es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la replicación del DNA y la segregación de los cromosomas para la generación de dos células independientes. Este proceso está dividido en varias fases en las que se desarrollan eventos particulares: la fase de mitosis, en donde se lleva a cabo el proceso de división celular y la interfase que a su vez incluye las fases  $G_1$ , S y  $G_2$ . Las células que se encuentran en fase  $G_1$  adquieren un compromiso de replicación, mientras que las células que se encuentran en reposo están en una fase  $G_0$ . Así la fase  $G_0$  es característica en la mayoría de las células del cuerpo (Fig.1).



**Fig. 1 Fases del ciclo celular.** Se indican los puntos de actividad de los diferentes complejos CDK/ciclina.

Tomado de Vermulen *et al.*, 2003.

La transición de una fase a otra dentro del ciclo celular ocurre de una manera ordenada y es controlada por gran variedad de proteínas celulares; aunado a esto, la existencia de puntos de control del ciclo celular permite que cualquier daño en la célula se repare y que las células descendientes no presenten anormalidades (Vermulen *et al.*, 2003).

De forma general el cáncer se caracteriza por una proliferación celular descontrolada, en la que pueden estar involucrados diversos procesos, entre los que se incluyen: la inactivación de proteínas supresoras de tumores como p53 y retinoblastoma (pRB) así como la interrupción de diversas vías metabólicas por interacción con proteínas involucradas en los procesos de adhesión celular, estabilidad genómica, proliferación celular, apoptosis, reparación de DNA, metabolismo, transcripción, traducción, ciclo celular, entre otros (Fang *et al.*, 2014).

En células normales, los productos de proto-oncogenes actúan a diferentes niveles en las rutas que estimulan la proliferación celular. Las mutaciones en proto-oncogenes u oncogenes pueden promover el desarrollo de un tumor; por otra parte la inactivación de genes supresores de tumores causa la pérdida de la función de las proteínas que normalmente actúan inhibiendo la progresión del ciclo celular. De esta forma la pérdida de la regulación asociada con cáncer ocurre por la mutación de proteínas importantes en distintos niveles del ciclo celular (Vermulen *et al.*, 2003).

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha logrado clasificar a más de 100 agentes carcinógenos para humanos (Cogliano *et al.*, 2011). Entre estos agentes se pueden mencionar: los agentes químicos, factores hormonales, algunos agentes biológicos como virus o bacterias, también está documentada la influencia de factores genéticos, entre otros agentes.

## **I.2 El cáncer cervicouterino.**

El cáncer cervicouterino (CaCu) se considera como un problema de salud mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo clasifica como el segundo tipo de

cáncer más frecuente en mujeres y como la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial (OMS, 2013). En México durante el 2013, los tumores malignos ocuparon el tercer lugar como causa de muerte en mujeres, después de las enfermedades del corazón y de *Diabetes mellitus*, registrando 37,371 defunciones; de estos tumores, el de cuello uterino causó 3,784 muertes en la población femenina a nivel nacional (INEGI, 2015).

A pesar de que la prueba de Papanicolaou es adecuada para el diagnóstico de CaCu en etapas tempranas de la enfermedad y que actualmente existen métodos profilácticos que ofrecen un efecto protector ante los tipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, que se relacionan con mayor frecuencia al desarrollo de CaCu (Gravitt, 2011), este cáncer continúa posicionándose como una de las principales causas de muerte por tumores malignos en mujeres, con mayor impacto en países en vías de desarrollo (Marzo-Castillejo *et al.*, 2012).

El desarrollo de CaCu implica una serie de eventos previos que se caracterizan por la aparición de lesiones que se clasifican en diferentes grados de neoplasia denominados: Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), las cuales pueden evolucionar a un cáncer invasor. El diagnóstico final de una NIC se lleva a cabo por examen histológico de una biopsia cervical. De manera general la NIC se caracteriza por la presencia de células indiferenciadas que poseen un núcleo voluminoso, polimorfismo nuclear y poco citoplasma.

Para determinar el grado de NIC se toma en cuenta la proporción del espesor del epitelio con células indiferenciadas. Con esta referencia la lesión se clasifica como NIC 1, cuando presenta células indiferenciadas que se ubican en las capas más profundas del epitelio. En el caso de la NIC 2 se observan cambios celulares restringidos a la mitad inferior o a los dos tercios inferiores del epitelio; pero se observan anomalías nucleares más marcadas que en NIC 1. Cuando se diagnostica una NIC 3 se observa que la diferenciación y la estratificación pueden faltar por completo, además se pueden observar anomalías nucleares en todo el espesor del epitelio (Fig.2).

La mayoría de las lesiones NIC 1 son transitorias y vuelven a ser normales en poco tiempo, o simplemente no evolucionan hacia formas más graves. Por el

contrario, las NIC de alto grado (NIC 2-3), tienen una probabilidad mayor de evolucionar hacia un cáncer invasor, aunque la mayoría de ellas también regresan o persisten sin evolucionar (Sankaranarayanan y Wesley, 2005).

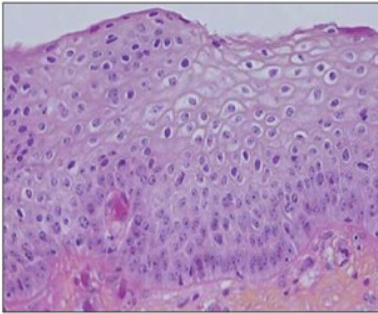


Fig.2.1 Histología de una NIC1: las células displásicas están confinadas en el tercio inferior del epitelio (x20).

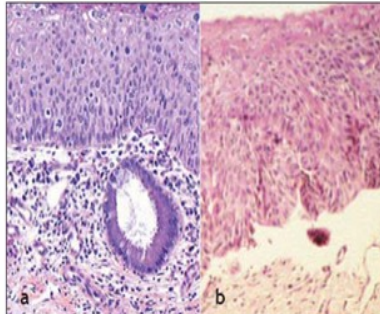


Fig.2.2 Histología de una NIC2: las células atípicas aparecen sobretodo en los dos tercios inferiores del epitelio (x10).

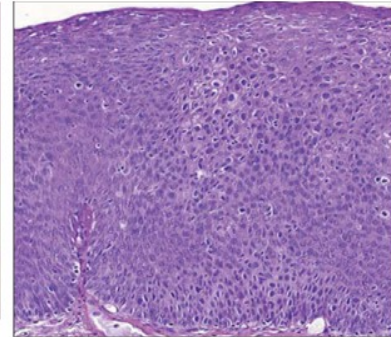


FIGURA 2.3 Histología de una NIC3: las células displásicas se distribuyen en el espesor epitelial con pérdida de polaridad de las células (x20).

**Fig. 2 Histología de los diferentes grados de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC).**

Modificado de: Sankaranarayanan y Wesley, 2005.

Existe otra forma de clasificar las lesiones de acuerdo con el sistema Bethesda, en donde se utiliza el término “Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado” (LSIL, por sus siglas en inglés), que abarca la infección con VPH, displasia leve y NIC 1. Mientras que el concepto de “Lesión escamosa intraepitelial de alto grado” (HSIL) se refiere a la displasia moderada, displasia severa, NIC 2-3 y carcinoma *in situ* (Solomon *et al.*, 2002).

El sistema de clasificación para el CaCu es el descrito por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). Este sistema de clasificación clínica está basado en el tamaño del tumor y en la extensión del cáncer en la pelvis. Se evalúa el grado de crecimiento del cáncer para determinar el estadio de la enfermedad, que puede ir desde el grado I hasta el grado IV.

El estadio I representa un tumor limitado al cuello de útero, mientras que el estadio IV corresponde a la fase de crecimiento en la cual el cáncer se ha

diseminado por metástasis en los órganos distantes (Sankaranarayanan y Wesley, 2005). El bajo porcentaje de NICs que evolucionan a cáncer, sugiere que existen factores ambientales así como factores propios del hospedero que están involucrados en la progresión de estas lesiones a CaCu (Hildesheim y Wang, 2002).

### **I.2.1 El virus del papiloma humano.**

Actualmente el virus del papiloma humano (VPH) es considerado el agente etiológico principal del CaCu ya que está asociado con hasta más del 99% de los diagnósticos de este tipo de cáncer (Herber *et al.*, 1996; Son *et al.*, 2013; Brake y Lambert, 2005; Lee *et al.*, 2013). Por este motivo aún no se han identificado factores que actúen de forma independiente a la infección con VPH en el desarrollo de CaCu (Magnusson y Gyllensten, 2000).

El VPH es un virus de DNA de doble cadena perteneciente a la familia *Papillomaviridae*, ampliamente distribuido en la naturaleza, que infecta epitelio escamoso de reptiles, aves y gran variedad de mamíferos (Muñoz *et al.*, 2003). En el humano el VPH infecta tejido epitelial mucoso y cutáneo. De acuerdo a su tipo el VPH puede infectar el tejido de manos, pies y tracto ano-genital (Davis-Devine *et al.*, 2005). A pesar de que existen más de 100 tipos de VPH, no todos poseen el mismo poder oncogénico (Muñoz *et al.*, 2003).

Se considera al VPH como el patógeno de transmisión sexual más común, ya que aproximadamente el 75% de individuos sexualmente activos han sido infectados con el virus (Brake y Lambert, 2005); por este motivo se considera a la infección con VPH una de las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) con mayor prevalencia a nivel mundial (Muñoz *et al.*, 2004). Se han reconocido cerca de 40 tipos de VPH que infectan genitales (Muñoz *et al.*, 2003), a su vez estos tipos de VPH han sido clasificados en dos grupos: VPH de bajo riesgo, y VPH de alto riesgo (Hausen, 1996).

Los VPH de bajo riesgo, por ejemplo: VPH6, VPH11 y VPH42, se encuentran en la mayoría de los condilomas genitales que son proliferaciones de tejido no malignas que afectan piel o mucosas (Hausen, 1996; Gravitt, 2011). Por

el contrario los VPH de alto riesgo, por ejemplo: HPV45, HPV16 y HPV18, se asocian con varios tipos de cáncer ano-genitales como cáncer de vulva, vagina, pene, ano, entre otros. (Muñoz *et al.*, 2003; Hausen, 2002), además estos tipos de VPH se asocian con el 20 al 30% de casos de cáncer en cabeza y cuello, particularmente de lengua, tonsilas y la orofaringe (Münger *et al.*, 2001).

Dentro del grupo de VPH de alto riesgo, los tipos 18 y 16 son los que se relacionan con mayor frecuencia con el desarrollo de NICs y el posterior desarrollo de CaCu, identificándose del 70 al 80% de los casos (Bulut *et al.*, 2011; Son *et al.*, 2013). De estos tipos de VPH, el VPH16 es el más prevalente, se identifica en el 55% de los casos de CaCu (Davis-Devine, 2005).

En su genoma, los VPH contienen genes de activación temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y genes de activación tardía (L1, L2) (Hausen, 1996). La evidencia molecular indica que las proteínas oncogénicas E6 y E7 son responsables de la inactivación de proteínas reguladoras del ciclo celular, p53 y Retinoblastoma (pRb) respectivamente (Slebos *et al.*, 1994).

La afinidad de unión de la proteína E7 de los VPH de alto riesgo es diez veces mayor que la afinidad de la proteína de los VPH de bajo riesgo. Heck y colaboradores en 1992 reportan que esta diferencia en afinidad parece ser el resultado de una modificación en un aminoácido en la posición 21 de la proteína E7. Esta característica sugiere que la capacidad de interacción de E6 y E7 con sus proteínas blanco delimita el poder oncogénico de cada tipo de VPH (Song *et al.*, 2000).

La infección por VPH se origina por contacto sexual con una pareja infectada con el virus. De forma general una lesión del tejido epitelial permite que las partículas virales infecten las células de la capa basal de este tejido en donde se localizan las células que se dividen y diferencian para sanar el tejido dañado y que al mismo tiempo replican el genoma del VPH, generando células con el DNA del virus (Hausen, 2002). En la actualidad se sugiere que la integrina  $\alpha$ -6 es el receptor involucrado en la interacción VPH16-célula. (Yoon *et al.*, 2001). La infección persistente con VPH es el principal factor involucrado en el desarrollo de



CaCu y es considerado como un requisito previo para la progresión a lesiones intraepiteliales de alto grado (Gao *et al.*, 2013).

Cuando los individuos son inmunológicamente competentes, la infección con VPH es pasajera y puede ser eliminada dentro de los siguientes dos años. Cerca del 90% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses, así solo el 5 a 10% de las mujeres infectadas con VPH desarrollarán HLISs (Magnusson y Gyllensten, 2000; Muñoz *et al.*, 2003). De las infecciones persistentes, cerca del 25%, dan pie al desarrollo de NICs las cuales representan un alto riesgo de desarrollo de NIC3, de éstas lesiones precursoras más de un tercio progresarán a CaCu e invadirán otros tejidos en un periodo de 10 a 20 años (McCredie *et al.*, 2008).

A pesar de la alta incidencia de la infección con VPH de alto riesgo, solo un bajo porcentaje de mujeres infectadas que presentan NICs desarrollan cáncer cervical (Prokopczyk *et al.*, 1997; Weiderpass y Labreche, 2012). Este hecho sugiere que la infección con VPH, a pesar de ser un requisito necesario, no es el único factor involucrado en el desarrollo de CaCu, lo que destaca que otros factores puedan estar involucrados en la carcinogénesis cervical (Gillet *et al.*, 2012).

### **I.2.2 Agentes químicos carcinógenos.**

Uno de los factores ampliamente relacionados con el desarrollo de CaCu es el tabaquismo. Un cigarro contiene cerca de 4000 compuestos, de los cuales algunos son considerados carcinógenos, entre estos se encuentran los compuestos policíclicos aromáticos y las nitrosaminas como el 4-(metilnitrosamino)-1-(3piridil)-1-butanona "NNK". En un estudio realizado por Prokopczyk y colaboradores en 1997, se observó que la mucosa cervical de mujeres fumadoras contenía niveles de NNK tres veces más altos que la mucosa cervical de las no fumadoras, argumentando que el compuesto pudo ser transportado al cérvix por vía sanguínea. Los autores sugieren que ésta NNK puede ser activada por enzimas del epitelio cervical y causar el daño al DNA de las células.

Existen también reportes sobre el efecto de otros agentes químicos como el fármaco sintético dietilestilbestrol que se ha determinado como un agente carcinógeno con suficiente evidencia del efecto que causa en cérvix en humanos cuando existe una exposición *in utero* (Weiderpass y Labreche, 2012; Cogliano *et al.*, 2011).

### **I.2.3 Factores hormonales.**

La IARC clasifica al estrógeno como un agente carcinógeno, basándose en resultados obtenidos a partir de diversos modelos de estudio (Liehr, 2000); sin embargo existe una controversia sobre el papel de los anticonceptivos hormonales en el desarrollo de CaCu. El rol que desempeña el estrógeno así como otras hormonas esteroideas es el control diferencial en la expresión de genes, algunos relacionados con la regulación del ciclo celular, así como la proliferación de las células responsivas a este estímulo (Hellberg, 2012).

Diversos estudios epidemiológicos retrospectivos han permitido relacionar el consumo de anticonceptivos hormonales con un mayor riesgo de desarrollo de CaCu, no obstante, este resultado puede estar influenciado por una infección con VPH de alto riesgo así como por el desarrollo de NICs. Por una parte se menciona que el uso de anticonceptivos hormonales se relaciona con el desarrollo de CaCu debido a que sustituye el uso de otras barreras de protección, por ejemplo condones, con lo que se aumenta el riesgo de adquirir la infección con VPH de alto riesgo (Longatto-Filho *et al.*, 2010). Hellberg en 2012 sugiere un mecanismo de infección por el que la administración de hormonas por vía exógena, puede dar origen a una ectopia cervical en la zona de transformación, esto puede incrementar la exposición de esta zona y al mismo tiempo puede facilitar la entrada del VPH en el epitelio cervical.

Por otra parte, el aumento de la  $\alpha$ -hidroxilación del estradiol a  $16\alpha$ -hidroxiestrone y estriol se ha identificado como un factor de riesgo de desarrollo de cáncer, la  $16\alpha$ -hidroxiestrone se une covalentemente al receptor de estrógeno prolongando el efecto sobre su blanco. Esta conversión se ve aumentada en células endocervicales inmortalizadas con VPH, así como en células de carcinoma

cervical lo que sugiere que ambos factores: la  $16\alpha$ -hidroxilación y la infección con VPH de alto riesgo incrementan los efectos de proliferación celular de cada uno (Gruber *et al.*, 2002).

Por cuestiones éticas, no es posible desarrollar un estudio del efecto de los anticonceptivos hormonales sobre el desarrollo de CaCu en humanos y los resultados publicados se limitan a estudios sobre el consumo de anticonceptivos durante periodos largos de tiempo en donde se han incluido datos que involucran a VPH (Hellberg, 2012). Sin embargo se encuentra bien documentado que ratones transgénicos que contienen los oncogenes E6 y E7 de VPH desarrollan cáncer cervical después del tratamiento con estrógeno ( $17\beta$ -estradiol) durante 6 a 9 meses (Brake *et al.*, 2003).

#### **I.2.4 Factores genéticos.**

El desarrollo de cáncer cervical es conocido como un proceso multifactorial por lo que parece involucrar, además de la infección con VPH, otros factores genéticos, biológicos y ambientales no descritos (Brake y Lambert, 2005). Así pues se reconoce que factores genéticos del hospedero juegan un papel importante en el desarrollo de NICs (Hildesheim y Wang, 2002).

La variabilidad genética del hospedero tiene impacto en la capacidad de respuesta a la infección con VPH, especialmente los factores genéticos que controlan la respuesta inmune, por esto, la asociación de la presencia de alelos específicos en moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA) con el riesgo de cáncer cervicouterino ha sido estudiada ampliamente (Chen y Gyllensten, 2014), indicando la existencia de alelos protectores y alelos que predisponen al desarrollo de CaCu. (Magnusson y Gyllensten, 2000).

De igual forma existe información sobre otros genes relacionados con el desarrollo de CaCu; por ejemplo el gen de la glutatión-S-transferasa (GST) que tiene la actividad de proteger a la célula de los efectos del estrés oxidativo. Las mutaciones en las isoformas de GST, GSTM1 y GSTT1 promueven el desarrollo de displasia cervical ya que influyen en la activación de compuestos que promueven la formación de aductos en el DNA.

Así mismo se han reportado estudios sobre el gen *mdm2* y el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), SNP309. De forma general MDM2 actúa como regulador negativo de p53; así, un cambio en la actividad de esta proteína puede asociarse con la acumulación de errores genéticos que pueden causar alguna enfermedad. El SNP309 origina una mayor afinidad del promotor de transcripción al factor transcripcional Sp1 generando una mayor producción de MDM2, con lo que se atenúa la actividad de p53. Esta actividad atenuada de p53 se ha observado en casos de CaCu (Nunobicki *et al.*, 2011).

### **I.2.5 La microbiota y su asociación con cáncer.**

A lo largo de la historia se han descrito gran variedad de factores que pueden cooperar en el desarrollo de cáncer; La participación de la microbiota, que se define como el conjunto de microorganismos que habitan en un entorno determinado, como un factor ambiental involucrado en la carcinogénesis es un tema que actualmente toma la atención de varios grupos de investigación (Whitmore y Lamont, 2014). Hoy en día se conoce que gran variedad de patógenos, incluidos entre estos a los virus, los cuales generan cáncer a través de mecanismos genéticos bien definidos (Moore y Chang, 2010).

En el caso de las bacterias, la infección con *Helicobacter pylori*, clasificado por la IARC como un carcinógeno, puede llevar al desarrollo de gastritis, úlcera gástrica, atrofia y finalmente cáncer de estómago (Fox y Wang, 2007). Existen autores que describen que algunas bacterias poseen características metabólicas que pueden compararse con los procesos involucrados en la carcinogénesis (Mager, 2006; Alistair y Warren, 2002).

Además, evidencia reciente sugiere que las enfermedades son originadas no solo por un agente patógeno sino también por cambios globales en la microbiota y en el microbioma que pueden alterar el microambiente causando daño al hospedero (Schawe y Jobin, 2013). En el caso del desarrollo de cáncer colorectal (CRC) los efectos promotores de tumor que ejerce la microbiota en él, parecen ser causados por disbiosis, que se define como el cambio en la proporción de bacterias con respecto a un estado saludable, más que por la

infección con organismos patógenos específicos (Grivennikov, 2013; Gao *et al.*, 2015).

En el estudio realizado por Sobhani y colaboradores en el 2011, se observó un aumento en abundancia de bacterias del género *Bacteriodes* sp y *Prevotella* sp en heces de pacientes con cáncer de colon cuando se comparan con muestras de pacientes sanos, junto a este cambio se observa un aumento de IL-17, que puede atribuirse al aumento de *Bacteriodes* sp, lo que muestra el efecto de los microorganismos del tracto digestivo en la regulación de la respuesta inmune.

Actualmente existen gran variedad de estudios que han permitido caracterizar los cambios en la microbiota del tracto digestivo en distintos padecimientos, y se ha sugerido la forma en que esta microbiota puede actuar como agente protector ante diversos patógenos, ya sea por la producción de sustancias propias así como por la modulación en el desarrollo y actividad del sistema inmunológico del hospedero, resaltando la función de la microbiota como uno de los factores ambientales que influyen en el estado de salud y de enfermedad del individuo (Clemente, *et al.*, 2012).

Por otra parte, se ha reportado que una disbiosis bacteriana es uno de los factores que puede generar cáncer en boca. Algunas especies como *Porphyromonas gingivalis*, pueden alterar el equilibrio del ambiente, lo que desencadena una interacción disbiótica hospedero-microbiota. Posteriormente otros constituyentes de ese ambiente como *Fusobacterium nucleatum*, que puede considerarse un patógeno oportunista, así como la desregulación de la respuesta inmune dan origen a padecimientos periodontales (Whitmore y Lamont, 2014).

En el estudio de Schmidt y colaboradores en el 2014 se analizaron muestras de cáncer oral por muestreo con hisopo encontrando que existe una disminución de bacterias de los fila Firmicutes y Actinobacteria así como un aumento en la proporción de Fusobacteria en las muestras de cáncer comparado con muestras de tejido sano del mismo individuo. En cuanto a género se observó aumento de *Fusobacterium* sp y de *Prevotella* sp, analizando con ello el posible uso de estos microorganismos como biomarcadores de cáncer oral.

A pesar de los avances en el estudio del posible papel de la microbiota en la tumorigenesis aún se necesita más conocimiento sobre esta relación en otros órganos que poseen diversidad de microbiota, como en pulmones, piel, cavidad oral y tracto reproductivo femenino (Schawe y Jobin, 2013).

#### **I.2.5.1 Microbiota del tracto reproductivo femenino y disbiosis.**

El conocimiento y caracterización de microorganismos comensales en distintas partes del cuerpo se logró mediante el uso de técnicas de cultivo para identificación de microorganismo, sin embargo estas técnicas no incluían la identificación de aquellos microorganismos no cultivables (Zhou *et al.*, 2004).

Mediante las técnicas de cultivo de microorganismos, en 1892, el médico alemán Albert Döderlein logró identificar grupos de bacilos Gram positivos, anaerobios estrictos o facultativos a partir de muestras de fluido vaginal. Estos bacilos se consideraron como microorganismos comensales del tracto vaginal y fueron designados como “bacilos de Döderlein”, los cuales fueron clasificados como *Lactobacillus vaginalis* y *L. acidophilus* (Sanchez-Hernández *et al.*, 2012); a partir de este estudio se reconoció el papel protector que ejercen los lactobacilos en el tracto reproductivo femenino, por su capacidad de generar y sobrevivir en un ambiente ácido (Weinstein y Howard, 1937).

A partir del desarrollo de tecnologías de secuenciación masiva fue posible la conformación del proyecto del microbioma humano (HMP). La finalidad de este consorcio es la de determinar el tipo de microorganismos existentes en varias zonas del cuerpo humano. Actualmente se han descrito los microbiomas de distintas cavidades, incluido el tracto reproductivo femenino. El microbioma vaginal está compuesto de gran variedad de especies bacterianas que en conjunto promueven el equilibrio de la mucosa vaginal (Pyles *et al.*, 2014).

En el estudio realizado por Lee y colaboradores en 2013 en grupos de gemelas coreanas, se determinó que la microbiota vaginal pertenecía a seis grandes filo: Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Actinobacteria, Tenericutes, y Proteobacteria. Del grupo de los Firmicutes, el género *Lactobacillus spp.* fue el

más abundante, detectándose en más del 77% de las muestras de mujeres sanas pre-menopausia.

Varios autores han descrito que el microbioma vaginal puede estar compuesto de gran variedad de microorganismos que pueden ser incluidos en cinco comunidades microbianas principales: El grupo I en donde se observó mayor prevalencia de *Lactobacillus crispatus*; el grupo II con dominancia de *L. gasseri*; el grupo III caracterizado por mayor presencia de *L. iners*; el grupo V dominado por *L. jensenii*; mientras que el grupo IV tiene proporciones menores de bacterias ácido-lácticas (BAL) y mayor proporción de organismos anaerobios estrictos entre los que se incluyen: *Prevotella* sp., *Dialister* sp., *Atopobium* sp., *Gardnerella* sp., *Megasphaera* sp., *Peptoniphilus* sp., *Sneathia* sp., *Eggerthella* sp., *Aerococcus* sp., *Fingoldia* sp., y *Mobiluncus* sp. (Ravel et al., 2011).

Es notorio que la mayoría de los microorganismos identificados pertenecen al grupo de *Lactobacillus* (Lee et al., 2013; Ravel et al., 2011) con especies que difieren de los identificados por Döderlein ya que la gran mayoría de estos microorganismos no crece en el medio de cultivo agar De Man Rogosa y fueron identificados tiempo después (Sanchez-Hernández et al., 2012).

A pesar de que se han logrado identificar estos grupos, es importante hacer notar que no existe un microbioma “core” per se, ya que la microbiota vaginal puede ser distinta entre mujeres, por ejemplo Ravel y colaboradores en 2011 describen que en un estudio realizado a mujeres asintomáticas se identificaron los grupos *Lactobacillus iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, o *L. jensenii*, como predominantes en el 80.2% y 89.7% de mujeres asiáticas y blancas respectivamente, mientras que estos grupos sólo se identificaron en el 59.6% y 61% de mujeres hispanas y africanas respectivamente.

Además puede existir una variación de la microbiota vaginal de una mujer a través del tiempo. Gajer y colaboradores en un estudio realizado en 2012 describen que hay casos donde la microbiota del tracto genital es constante, pero en determinado porcentaje de las muestras existió poca estabilidad de la microbiota, relacionada en algunos casos con la aparición del periodo menstrual.

De igual forma el tipo de microbiota puede verse influido por algunos factores como el uso de medicamentos y el tratamiento con estrógenos así como por los hábitos sexuales (Castellsagué *et al.*, 2002; Kazi *et al.*, 2012). Es conocido que los niveles de estrógenos pueden influir en la variabilidad de la microbiota vaginal (Mikamo *et al.*, 1999).

En el estudio realizado por Lee y colaboradores en 2013, se demuestra que existe un aumento en la variabilidad de la microbiota vaginal en mujeres en post-menopausia y que estos cambios se deben en su mayoría a los cambios hormonales, esto se deduce porque la variabilidad de la microbiota vaginal de muestras de mujeres en post-menopausia que recibieron tratamientos hormonales disminuyó dramáticamente y fueron similares a los resultados de las muestras de mujeres en pre-menopausia, en donde existía una predominancia de lactobacilos.

La variabilidad de la microbiota de la vagina, igual que la de otras cavidades y superficies en el cuerpo, está relacionada con el equilibrio y salud del organismo (Kim *et al.*, 2009). Estos microorganismos mantienen un pH adecuado, que funcionan como barrera para prevenir la infección con organismos patógenos, estimulan el desarrollo del sistema inmune innato, entre otras actividades (Drell *et al.*, 2013).

Los lactobacilos, que de forma general se consideran como elementos característicos de un ambiente vaginal saludable, parecen cumplir con un papel importante en la conservación de este ambiente (Ravel *et al.*, 2011), que al mismo tiempo significan una barrera de protección primaria contra otros agentes microbianos considerados patógenos (Gajer *et al.*, 2012). Los mecanismos de protección de los lactobacilos son: competencia con otros microorganismos por los nutrientes y adherencia al epitelio vaginal; producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y la reducción de pH mediante la producción de ácido láctico, a partir del glucógeno que se produce en las células epiteliales cervicales (Kim *et al.*, 2009).

De las comunidades microbianas dominadas por *Lactobacillus sp.* se reconoce a *L. crispatus* por su habilidad para disminuir el pH vaginal a 4.0 en comparación a otros lactobacilos que generan un pH de 4.4 a 5.0, mientras que



las comunidades del grupo IV genera un pH de 5.3 aproximadamente, mostrando que el ambiente vaginal puede ser diverso de acuerdo a la comunidad bacteriana presente (Ma *et al.*, 2012).

El desequilibrio de la microbiota vaginal, que involucra tanto la reducción o desaparición de los grupos de lactobacilos, es característico de dos condiciones patológicas: vaginitis aerobia (VA) y vaginosis bacteriana (VB). De manera general la VA corresponde a un aumento de microorganismos del intestino como *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* spp., entre otros y está relacionada con la mayoría de los casos de partos pre-termino, mientras que la VB es el resultado del aumento de bacterias anaeróbicas como *Prevotella* sp, *Bacteroides* sp, *Mobiluncus* sp, *Gardnerella vaginalis* y micoplasmas genitales como *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, de etiología poco conocida (Krauss-Silva *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2013; Tansarli *et al.*, 2013). La VB se caracteriza por ser una condición en la cual la secreción vaginal presenta escasas señales inflamatorias, los leucocitos son escasos y esa condición es similar a la que se presenta en mujeres cuya mucosa es normal (Krauss-Silva *et al.*, 2014).

Un desequilibrio en la diversidad de la microbiota, como en los casos de VB puede asociarse con susceptibilidad a infecciones de transmisión sexual, entre las que se pueden incluir las infecciones con VPH y VIH (Lee *et al.*, 2013). Además existen reportes epidemiológicos que relacionan la presencia de infecciones con *Gardnerella vaginalis*, así como la infección con *Trichomonas vaginalis* con el desarrollo de NICs (Gao *et al.*, 2013).

## II. ANTECEDENTES

Se sabe que además de la infección con VPH de alto riesgo, existen otros factores que predisponen al desarrollo de CaCu, tal es el caso de tabaquismo, edad, mayor número de parejas sexuales, estado inmunológico del hospedero así como el uso de anticonceptivos hormonales (Sunthamala *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 2010; Prokopczyk *et al.*, 1997).

Actualmente existe una serie de estudios sobre el posible papel que puede desempeñar la microbiota vaginal en la infección persistente con VPH (Lee *et al.*, 2013). Algunos reportes sugieren que la presencia de infecciones bacterianas puede incluirse como uno de los factores involucrados en el desarrollo de lesiones intraepiteliales (Behbakht *et al.*, 2002).

Existen gran variedad de estudios que describen la posible relación entre el desequilibrio de la microbiota y la infección con VPH. Diferentes autores argumentan que de acuerdo a sus resultados, la VB es una característica que influye en el establecimiento de la infección con VPH (Gao *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013; Gillet *et al.*, 2011).

En el estudio de Lee y colaboradores en el 2013, se pudo observar que existe una diferencia en la composición de la microbiota de mujeres que presentan infección con VPH, representada por aumento en la abundancia de microorganismos de los géneros *Prevotella*, *Sneathia*, *Dialister* y *Bacillus*.

De igual forma en el estudio de Gao y colaboradores del 2013 se observó que cuando se comparan muestras de mujeres infectadas con VPH con muestras de mujeres no infectadas existe un cambio en la diversidad microbiana, resaltando que en las muestras de mujeres infectadas hay un aumento de *Gardnerella vaginalis* y de *Lactobacillus gasseri* sugiriendo la participación de la microbiota vaginal como co-factor para la infección por VPH.

Finalmente, en un meta-análisis de datos realizado por Gillet y colaboradores en el 2011, después del análisis de doce artículos relacionados con VB e infección por VPH, se pudo concluir que existe una asociación entre estas dos condiciones.

Cuando se analizó la relación entre VB y la presencia de NICs, Boyle y colaboradores en el 2003 observaron que no existe diferencia entre las mujeres que presentan VB en comparación con mujeres sanas, sin embargo estas variables si se relacionan cuando se analizan las muestras de mujeres infectadas con un tipo de VPH.

Resultados similares fueron obtenidos por Discacciati y colaboradores en el 2006, en donde se observó un aumento en el registro de VB en muestras de LSIL en comparación con muestras con citología normal, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa, no obstante, los autores mencionan que en su estudio no se incluyeron análisis sobre otros factores confusores por ejemplo la presencia de VPH.

Por el contrario, de acuerdo al meta-análisis de datos realizado por Gillet y colaboradores en 2012, existen grupos de investigación que muestran una relación entre VB y desarrollo de NICs, sugiriendo que los cambios en la microbiota del tracto reproductivo originan variaciones en el microambiente que a su vez llevan a un estado de inflamación crónica y a la producción de sustancias como propionato y butirato que pueden tener un efecto dañino sobre el epitelio cervical.

A pesar de que actualmente es difícil determinar si la VB es la causa de la infección con VPH o si, por el contrario, después de la infección por VPH se presenta una disbiosis que da origen a la VB, algunos reportes que asocian la presencia de VB con el desarrollo de lesiones intraepiteliales justifican este efecto por la capacidad que tienen los microorganismos de producir nitrosaminas así como de estimular la liberación de citocinas como interleucina-1- $\beta$  (Behbakht *et al.*, 2002). Los primeros reportes que indican que la microbiota está relacionada con la aparición de lesiones intraepiteliales y con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer sugieren esta hipótesis basados en la producción de nitrosaminas (Pavic, 1984).

Las nitrosaminas son sustancias que resultan del proceso de nitrosación de las aminas: esta reacción puede ser catalizada por enzimas bacterianas; así pues la combinación de aminas, nitritos, nitratos y bacterias que puede encontrarse en

el tracto reproductivo de mujeres que cursan una VB aumenta la posibilidad de que se lleve a cabo la producción de nitrosaminas que puedan ejercer su actividad en el cérvix (Boyle *et al.*, 2003). Pavic en 1984 hace analogías entre el cáncer cervical y cáncer gástrico, menciona que en ambos sitios existe un ambiente con pH ácido que tiene un efecto protector y que en ambos tejidos el aumento del pH permite la proliferación de bacterias que pueden ser capaces de sintetizar nitrosaminas. Las hipótesis de Pavic asumen que las nitrosaminas producidas pueden actuar de forma independiente en el cérvix, pero es posible que este efecto sea sinérgico con otro agente, en este caso el VPH (Boyle *et al.*, 2003).

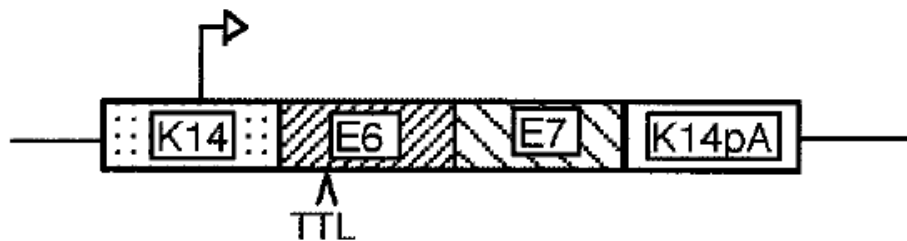
Además existen reportes sobre la presencia de microorganismos anaerobios, que proliferan en casos de VB y su relación con NICs, sugiriendo que estos microorganismos pueden actuar como iniciadores de CaCu (Mikamo *et al.*, 1999). En el estudio realizado por Wolrath y colaboradores en 2001 se demostró que existe un aumento de la concentración de aminas putrescina, cadaverina y tiramina, en muestras de pacientes con VB en comparación con las muestras de pacientes sanas.

A pesar de que se han descrito las variaciones de la microbiota del tracto reproductivo femenino y su posible asociación con la susceptibilidad y persistencia de la infección por VPH así como con el posible desarrollo de NICs y su asociación con el desarrollo de distintos tipos de cáncer ginecológicos, pocos estudios han incluido la caracterización de la microbiota intestinal durante la carcinogénesis y se han limitado a usar las técnicas de secuenciación masiva para examinar la microbiota intestinal de pacientes con cáncer que se someten a radioterapias o quimioterapias; sin embargo, conocer las variaciones de este grupo de microorganismos junto con los microorganismos del tracto reproductivo, puede ayudar a comprender el estado general del individuo durante el desarrollo de la enfermedad y conocer qué microorganismos pueden estar actuando como protectores, o en su defecto, contribuir al estado de enfermedad (Chase, *et al.*, 2015)

### II.1 Ratón transgénico K14HPV16E7.

El uso de modelos de estudio permite obtener información con base en los resultados observados en un sistema semejante al de interés; en el caso de CaCu existe un modelo murino que ha sido el modelo de elección para conocer distintos aspectos de la carcinogénesis.

El modelo de ratón transgénico K14HPV16E7 (K14E7) posee los marcos abiertos de lectura (ORF) de las proteínas E6 y E7 de VPH16 bajo el promotor de Queratina 14 (K14), posee un terminador de la traducción en la región de E6 (TTL) lo que permite sólo la expresión de la proteína E7. Este modelo desarrolla las lesiones características de CaCu cuando recibe un tratamiento con 17  $\beta$ -estradiol (E2) en un periodo de seis meses, dependiendo de la dosis administrada. Este modelo *in vivo* ofrece la capacidad de dar seguimiento a una variable de interés durante el desarrollo de la enfermedad, información que en mujeres no puede obtenerse por la naturaleza de la enfermedad (Brake y Lambert, 2005).



Modificado de Herber, *et al.*, 2006.

**Fig. 3** Expresión de HPV16E7 en ratón transgénico. Representación esquemática del transgen, se observa el promotor/potenciador de queratina humana 14 (K14), (E6, E7) marcos de lectura abiertos (ORF) de VPH16 E6 y E7; (K14pA) secuencias de poliadenilación de K14; se ilustra la posición del enlazador terminador de la traducción TTL.

### III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que actualmente existen métodos profilácticos para la infección por VPH, las muertes por CaCu siguen formando parte de las estadísticas de mortalidad a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo. Debido a que no se conoce qué factores desencadenan la progresión de la infección a CaCu, la microbiota residente del tracto reproductivo se convierte en objeto de estudio para tratar de explicar la influencia que ésta tiene sobre el desarrollo de la enfermedad. Por este motivo el uso de un modelo *in vivo* que desarrolla las lesiones características de la enfermedad permitirá aportar información sobre la asociación de una disbiosis de la comunidad bacteriana del tracto reproductivo femenino con la aparición de CaCu y permitirá ampliar el panorama para estudios posteriores sobre el papel de la microbiota como cofactor en el desarrollo de CaCu.

### IV. HIPÓTESIS

Durante el desarrollo de CaCu en el modelo murino K14E7 existe una disbiosis progresiva que modifica la diversidad microbiana, esta disbiosis es un evento previo a la aparición de lesiones observables relacionadas a CaCu en el modelo de estudio.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

Investigar si existe disbiosis del tracto reproductivo de ratones hembra K14E7 durante el proceso de carcinogénesis inducida por tratamiento exógeno con  $17\beta$ -estradiol.

## **OBJETIVOS PATICULARES**

1. Inducir CaCu en cepas de ratones transgénicos K14E7 utilizando  $17\beta$ -estradiol.
2. Colectar muestras de lavados de tracto reproductivo y copro de los ratones K14E7 y controles no transgénicos.
3. Establecer una genoteca de ácidos nucleicos extraídos de las muestras del modelo murino.
4. Llevar a cabo el seguimiento de la diversidad de la microbiota por análisis metagenómico.
5. Efectuar el análisis de los resultados obtenidos.

## VI. ALCANCE

Para cumplir con los objetivos de este proyecto se trabajará con un modelo de ratón transgénico K14E7 ampliamente utilizado y validado como modelo de estudio de CaCu, el cual permitirá observar la dinámica de la microbiota del tracto reproductivo desde el estado sano hasta el franco desarrollo de cáncer. Este modelo permitirá demostrar si existen cambios en la microbiota durante la carcinogénesis y tratar de conocer el punto en donde se origina este cambio con la finalidad de sugerir la secuencia de los eventos disbiosis–CaCu.

Los análisis de secuenciación masiva semiconductor de iones se limitarán a demostrar la variación de las comunidades microbianas presentes en las muestras analizadas, permitiendo evidenciar si algún grupo bacteriano, género de microorganismos, predomina en determinada etapa de la carcinogénesis, sin embargo, se necesitarán estudios posteriores que permitan sugerir si la disbiosis esperada es consecuencia o causa de la enfermedad y de qué forma este grupo de microorganismos puede relacionarse con el desarrollo de cáncer, involucrando posibles vías de señalización, producción de metabolitos y cambios en la respuesta inmunológica del individuo.



## VII. METODOLOGÍA.

### VII.1 PLAN DE TRABAJO.

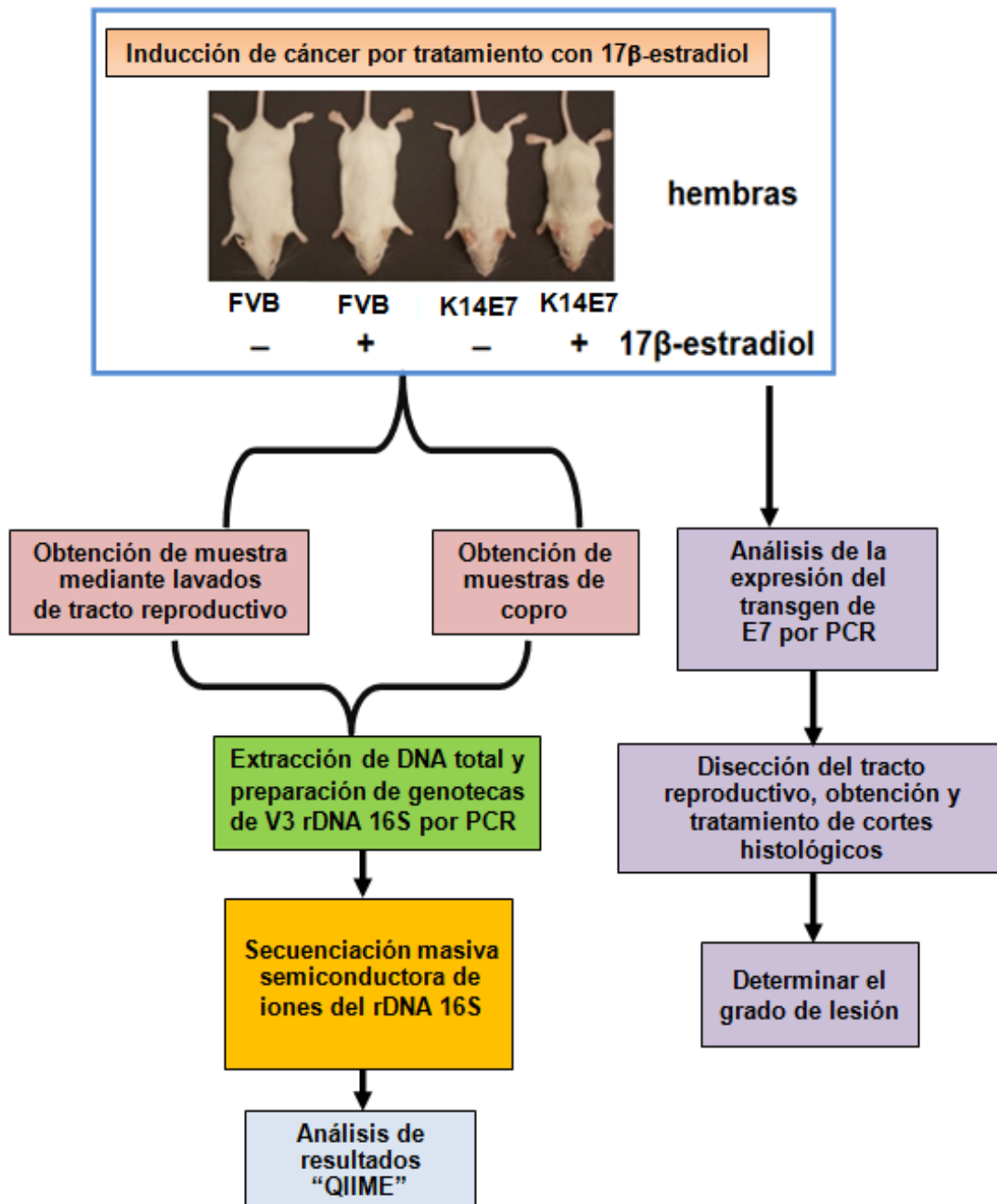


FIG. 4 Diagrama general de trabajo.

## VII.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS.

### VII.2.1 Inducción de cáncer cervicouterino en el modelo de ratón transgénico.

Los ratones utilizados fueron albergados en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio UPEAL- CINVESTAV y manejados de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 sin limitación de alimento o agua.

La inducción de cáncer cervicouterino se llevó a cabo en ratones hembra como se describe en Lambert y Brake 2005. Ratones transgénicos (K14E7) y no transgénicos (FVB/N) con 1 mes de edad fueron sometidos a tratamiento hormonal con  $17\beta$ -estradiol. Los ratones se anestesiaron por vía subcutánea con isoflurano y se llevó a cabo la implantación, por vía intradérmica en la piel dorsal, de comprimidos de liberación continua de  $17\beta$ -estradiol (0.05 mg/comprimido) durante 60 días. Para cumplir con el tratamiento de 6 meses se utilizaron tres comprimidos.

### VII.2.2 Obtención de tejido y tratamiento.

La obtención y tratamiento del tejido del tracto reproductivo de ratón se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en Diaz-Chavez *et al.* 2008. Los ratones se sacrificaron por anestesia con una solución 2.5% de Avertina y se pasó una solución 4% de formaldehído a través de la aorta. Se llevó a cabo la disección del tracto reproductivo, incluyendo vagina, cérvix y trompas de Falopio, se realizó la fijación posterior a 4° C toda la noche y se removió la pared posterior de la vagina para orientación. El tejido se embebió en parafina y se obtuvieron cortes de 100 $\mu$ m hasta observar el canal cervical, después de esto se hicieron cortes seriales de 5 $\mu$ m a través del cérvix. Los cortes se sometieron a tinción Hematoxilina- Eosina (H-E) y se evaluaron por patología (Anexos A y B).

### VII.2.3 Detección del transgén de HPV16 E6/E7.

La detección del transgén de E6/E7 se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) y el Laboratorio Nacional Frederick-USA. Se llevó a cabo la extracción de DNA y posteriormente se realizó una PCR utilizando los iniciadores que amplifican la región del transgén de E6 y E7 de acuerdo a lo descrito en la tabla 1, en un volumen final de reacción de 50  $\mu$ L. Después de esta reacción se llevó a cabo una digestión con la enzima HpaI, esta digestión permitió obtener dos productos de aproximadamente 638 pb y 167 pb en el caso de E6 y dos fragmentos de 720 pb y 85 pb en el caso de E7.

Tabla 1. Iniciadores y condiciones empleadas para la detección del transgén E6/E7.

Iniciadores:		
H005 :	<b>5'-TTTTATGCACCAAAGAGAACTG -3'</b>	
H006 :	<b>5'-TACCTG CAGGAT CAGCCATG -3'</b>	
Tamaño del producto:		
	805 pb	
Mezcla de reacción:		
	Reactivo	Concentración Final
	<b>Buffer10X</b>	1X
	<b>MgCl<sub>2</sub>25mM</b>	2.0 mM
	<b>dNTPs2.5mM</b>	0.2 mM
	<b>H005 100 <math>\mu</math>M</b>	0.5 $\mu$ M
	<b>H006 100 <math>\mu</math>M</b>	0.5 $\mu$ M
	<b>Taq Pol 5U/<math>\mu</math>l</b>	0.025 U/ $\mu$ l
	50 - 100 ng de DNA por reacción	
Programa de amplificación.		
	Temperatura	Tiempo (min)
<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	3:00
<b>Desnaturalización</b>	94°C	1:00
<b>Alineamiento</b>	60°C	2:00
<b>Extensión</b>	72°C	1:00
<b>Extensión final</b>	72°C	3:00
	4°C	-

### VII.2.4 Obtención de muestras de tracto reproductivo y copro de ratones.

La obtención de muestras del tracto reproductivo de ratones hembra se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en Barfod, *et al.* 2013, con las modificaciones

indicadas enseguida: se tomaron muestras de lavados de tracto reproductivo introduciendo la punta una pipeta estéril en el espacio vaginal descargando y tomando 3 veces 20  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS 1X), la muestra se colectó en tubos para microcentrifuga de 0.6 ó 1.5 mL; cuando las muestras no se procesaron de forma inmediata, fueron conservadas en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  ó  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Se colectaron muestras de copro directamente de los ratones, recuperando la píldora en tubos para microcentrifuga, se aseguró que las muestras no entraran en contacto con la cama de aserrín. Cuando las muestras no se procesaron de forma inmediata, fueron conservadas en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  ó  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **VII.2.5 Extracción y purificación de DNA genómico.**

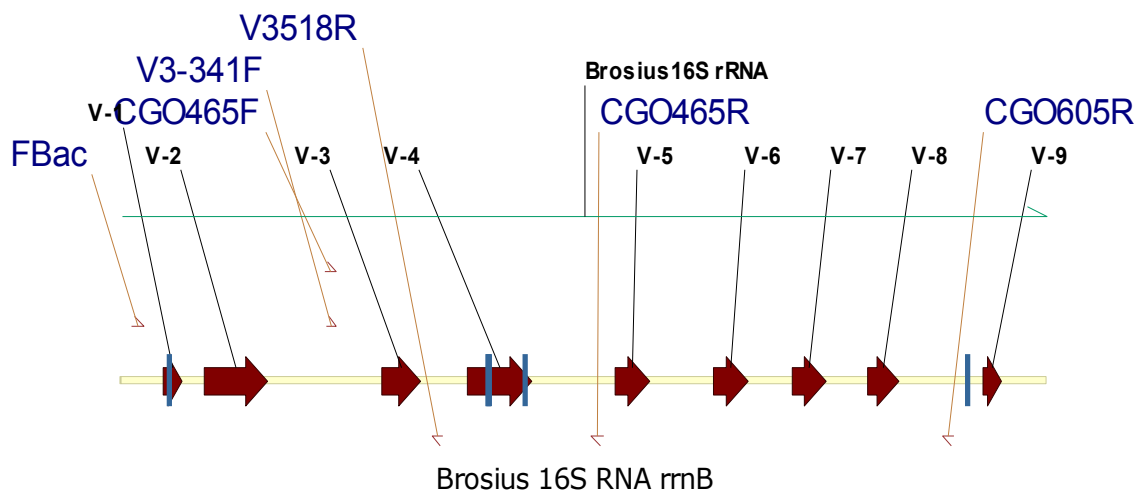
Para la extracción del DNA total se utilizó en kit de extracción de DNA “QIAGEN, QIAamp DNA Stool Mini Kit®” siguiendo las indicaciones del fabricante con las siguientes modificaciones: En las muestras de lavado vaginal, el volumen final de elución de DNA con solución AE fue de 50  $\mu\text{L}$ . Para el caso de las muestras de copro se utilizó un volumen de solución AE de 100  $\mu\text{L}$ . Para obtener el DNA a partir de las muestras de copro también se utilizó el kit de extracción de DNA “PowerSoil® DNA Isolation Kit” siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se determinó la concentración de DNA total purificado, así como el cociente  $A_{260/280}$  utilizando el equipo NanoDrop Lite Spectrophotometer de Thermo Scientific; de igual forma se llevó a cabo el fraccionamiento electroforético de DNA total en gel de agarosa al 0.5 % teñido con 0.70  $\mu\text{L}$  de colorante Midori Green advanced (1:15), utilizando regulador de corrida TBE (Tris-Borato-EDTA), mezclando 2  $\mu\text{L}$  de regulador de carga (azul de bromofenol, glicerol 2X), con 2  $\mu\text{L}$  de DNA, aplicando 100 Volts durante 35-40 min y observando en el sistema de documentación “Molecular Imager® Gel Doc™ XR de Bio-Rad”.

#### **VII.2.6 Amplificación de región V3 de rDNA 16S.**

Como prueba de la presencia de DNA de origen bacteriano en las muestras que se utilizaron para preparar las genotecas para secuenciación masiva, se llevó a

cabo una PCR para amplificar las regiones polimórficas V3 y V4 del gen de rDNA 16S (Fig. 5) utilizando los iniciadores y condiciones descritas en la tabla 2, trabajando con un volumen final de 50  $\mu$ L por reacción.



**Fig. 5 Regiones polimórficas de del gen 16S RNA de *Escherichia coli* K-12.** En la imagen se ilustra el gen de RNA ribosomal 16S del cistron *rrnB* de *E. coli*, con un tamaño de 1541 pares de bases; la secuencia obtenida por Brosius y colaboradores en 1978 contiene nueve regiones polimórficas. En letras negras y líneas negras se ilustran las regiones polimórficas (V1-V9), en letras azules y líneas doradas se ubican los pares de iniciadores utilizados para distintas pruebas.

Tabla 2. Iniciadores y condiciones empleadas para la amplificación de las regiones V3-V4 del gen rDNA 16S.

Iniciadores:

CGO 465F : **5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'**

CGO 465R : **5'-CTACCAGGGTATCTAATCCTG - 3'**

Tamaño del producto:

465 pb

Mezcla de reacción:

Reactivo	Concentración Final
Buffer10 X	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.0 mM
dNTPs 10 mM	0.2 mM
CGO 465F 10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
CGO 465R 10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
Taq Pol 5U/ $\mu$ l	0.025 U/ $\mu$ l
50 o 100 ng de DNA por reacción	

Programa de amplificación.

	Temperatura	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	95°C	5:00	
Desnaturalización	94°C	0:30	
Alineamiento	55.3°C	0:30	25 Ciclos
Extensión	72°C	0:30	
Extensión final	72°C	10:00	
	10°C	10:00	

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

Las amplificaciones se hicieron en un termociclador “2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems”. Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.70  $\mu$ L de colorante Midori Green advanced (1:15) y utilizando regulador de corrida TBE, mezclando 1 $\mu$ L de regulador de carga, 1 $\mu$ L de agua grado PCR y 5 $\mu$ L del producto de reacción, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®). Se aplicaron 100 Volts durante 50 minutos y se obtuvo la imagen en el sistema de documentación “Molecular Imager® Gel Doc™ XR de Bio-Rad”.

#### **VII.2.6.1 PCR anidada.**

Para las muestras de lavado vaginal, en las que se detectó una baja concentración de DNA, se llevó a cabo una PCR anidada utilizando, en una primera reacción, un par de iniciadores que amplifican un fragmento de 1386pb del gen 16S rDNA *rrnB* (Fig. 5). Los iniciadores y las condiciones de reacción se describen en la tabla 3.

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

Las amplificaciones se hicieron en un termociclador “2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems”

Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% como se describió previamente.

Tabla 3. Iniciadores y condiciones empleadas para la amplificación del gen rDNA 16S.

<b>Iniciadores:</b>			
<b>FBac :</b> 5'- ATCATGGCTCAGATTGAACGC -3'			
<b>CGO 605R :</b> 5'-CCCGGGAACGTATTCACCG - 3'			
<b>Tamaño del producto:</b>			
1386 pb			
<b>Mezcla de reacción:</b>			
<b>Reactivo</b>		<b>Concentración Final</b>	
Buffer10 X		1X	
MgCl <sub>2</sub> 25 mM		2.0 Mm	
dNTPs 10 mM		0.2 Mm	
FBac 10 µM		0.2 µM	
CGO 605R 10 µM		0.2 µM	
Taq Pol 5U/µl		0.025 U/µl	
<b>50 ng de DNA por reacción</b>			
<b>Programa de amplificación.</b>			
	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo (min)</b>	
Desnaturalización inicial	95°C	5:00	
Desnaturalización	94°C	0:30	25 Ciclos
Alineamiento	59.7°C	0:30	
Extensión	72°C	0:30	
Extensión final	72°C	10:00	
	10°C	10.00	

Del producto de esta primera reacción se tomó un volumen de 1 µL como DNA molde para llevar a cabo una segunda PCR utilizando el par de iniciadores CGO 465 (Fig.5), esperando obtener un fragmento de 465 pb, las condiciones de reacción se describen en la tabla 2. De igual forma se llevó a cabo la electroforesis bajo las condiciones descritas previamente.

#### VII.2.6.2 Preparación de genotecas de la región V3 del gen rDNA 16S.

Cuando se demostró la presencia de DNA de origen bacteriano que puede ser amplificado se llevó a cabo la preparación de las genotecas, correspondientes a lavado vaginal y copro, del gen rDNA 16S que abarca la región polimórfica V3 (Fig. 5) además de una secuencia de nucleótidos única para marcar cada muestra denominada "barcode" así como secuencias adaptadoras útiles en la tecnología de secuenciación masiva semiconductora de iones (Tabla 4) (Anexo C).

Se hicieron reacciones de PCR con las condiciones descritas en la tabla 5.

Tabla 4. Iniciadores con “barcodes” utilizados para la preparación de genotecas de región polimórfica V3 del gen rDNA 16S.

Nombre del Iniciador	Ion Torrent “Linker”	Barcode (GOLAY)	Espaciador	Iniciador 16S rRNA (5' – 3')
V3-341 F1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GATCTGCGATCC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAGCTCATCAGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAACAACAGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCAACACCATCC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCGATATATCGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGCAATCCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTCGTGCACAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GATCTGCGCGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG

Tabla 5. Iniciadores y condiciones empleadas para la amplificación de la región V3 del gen 16S rDNA, insertando “barcodes”.

<b>Iniciadores:</b>			
<b>V3 341F:</b> 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG -3'			
<b>V3 518R:</b> 5'- ATTACCGCGGCTGCTGG- 3'			
<b>Tamaño del producto:</b>			
281 pb			
<b>Mezcla de reacción:</b>			
<b>Reactivo</b>		<b>Concentración Final</b>	
Buffer10 X		1X	
MgCl <sub>2</sub> 25 mM		2.0 mM	
dNTPs 10 mM		0.2 mM	
V3 341F 10 µM		0.2 µM	
V3-518R 10 µM		0.2 µM	
Taq Pol 5U/µl		0.025 U/µl	
<b>50 ng de DNA por reacción</b>			
<b>Programa de amplificación.</b>			
	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo (min)</b>	
Desnaturalización inicial	95°C	5:00	
Desnaturalización	94°C	0:30	25 Ciclos
Alineamiento	62°C	0:30	
Extensión	72°C	0:30	
Extensión final	72°C	10:00	
	10°C	10.00	



Se llevó a cabo el análisis de la calidad de los amplicones generados en cada muestra por fraccionamiento electroforético analítico en geles de agarosa al 2.0% utilizando la metodología descrita previamente; el tamaño esperado de estos fragmentos fue de 281 pb.

Después de observar que se obtuvieron los amplicones del tamaño aproximado a 281 pb, se llevaron a cabo reacciones masivas de PCR de cada muestra con la finalidad de tener mayor volumen de producto de reacción. Estas reacciones se llevaron a cabo en las condiciones y utilizando el programa de amplificación descritos previamente.

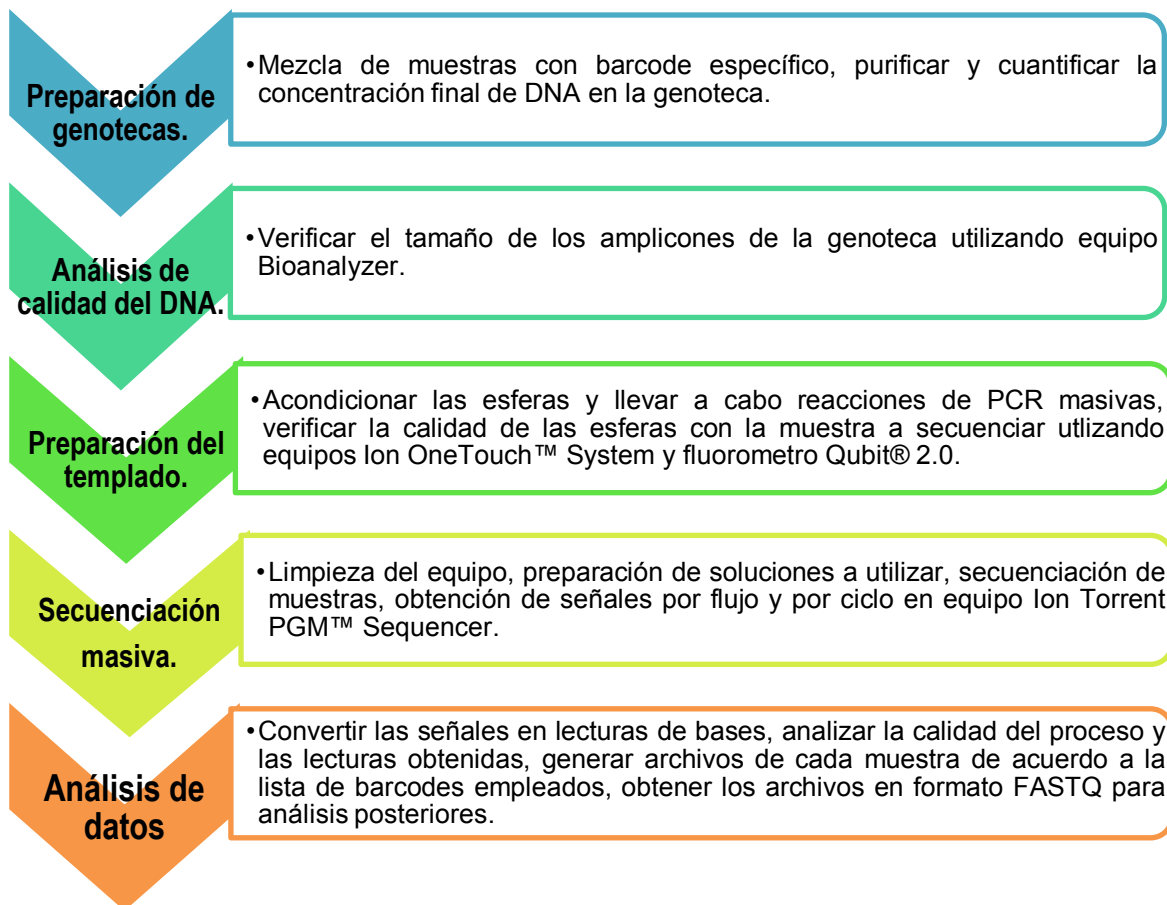
Para preparar la genoteca se llevó a cabo una mezcla de todos los productos de PCR a una concentración equivalente y se llevó a cabo una electroforesis en gel preparativo de agarosa al 2.0%, bajo las condiciones descritas previamente.

Se cortó la banda correspondiente al tamaño esperado 281 pb y se llevó a cabo la purificación del producto de PCR utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de la casa comercial Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Finalmente, se llevó a cabo una electroforesis en gel analítico de agarosa al 2.0% en las condiciones descritas con antelación con el propósito de verificar el tamaño del producto de PCR purificado, de igual forma se determinó la concentración de DNA recuperado.

#### **VII.2.7 Estudio metagenómico de la diversidad bacteriana.**

Después de que se preparó la genoteca de amplicones para las muestras de lavado vaginal y de copro, el personal capacitado para el manejo del equipo llevó a cabo el análisis de calidad así como el acondicionamiento de las genotecas de acuerdo al siguiente diagrama de flujo:



Cuando la calidad de las muestras fue adecuada se llevó a cabo la secuenciación masiva semiconductora de iones en el equipo ion torrent, utilizando los “Ion Semiconductor Sequencing Chip” 316 y 318, para las genotecas de lavado vaginal y copro respectivamente, ambos con una capacidad de más de 100 Mb y una lectura de 400 pb.

Se realizó la depuración del archivo de secuencias de cada genoteca para su análisis bioinformático utilizando el programa QIIME bajo los parámetros establecidos y se hizo la comparación con la base de datos de secuencias de rDNA 16S bacteriano.

### **VII.2.8 Análisis de resultados.**

Las lecturas obtenidas por el equipo se procesaron utilizando el “software Torrent Suite v4.4.3” Se asignaron las lecturas a la muestra de origen por medio del “barcode” y las lecturas que no cumplieron con estándares de calidad establecidos fueron excluidas del análisis.

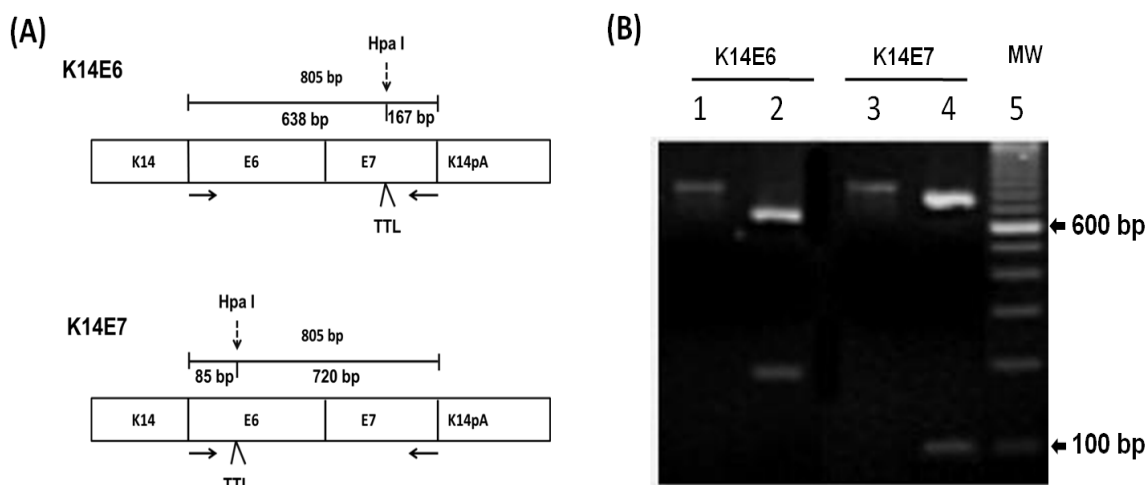
Las lecturas que pasaron las pruebas de calidad fueron exportadas como archivos FASTQ que fueron transformados a archivos FASTA, los que se analizaron en QIIME v1.9.0. Las secuencias se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) con un 97% de similitud, utilizando el algoritmo UCLUST. Las quimeras se eliminaron del análisis usando ChimeraSlayer y la asignación taxonómica se llevó a cabo por el alineamiento de las secuencias contra la base de datos Green Genes.

La diferencia de diversidad alfa entre grupos de muestras se llevó a cabo utilizando un método no paramétrico por permutaciones de Montecarlo. Los análisis de diversidad beta se llevaron a cabo utilizando UniFrac generando diagramas de coordenados principales.

La abundancia relativa de los grupos bacterianos identificados en las muestras se compararon por el método no paramétrico U de Mann Whitney utilizando el software Minitab® 17.

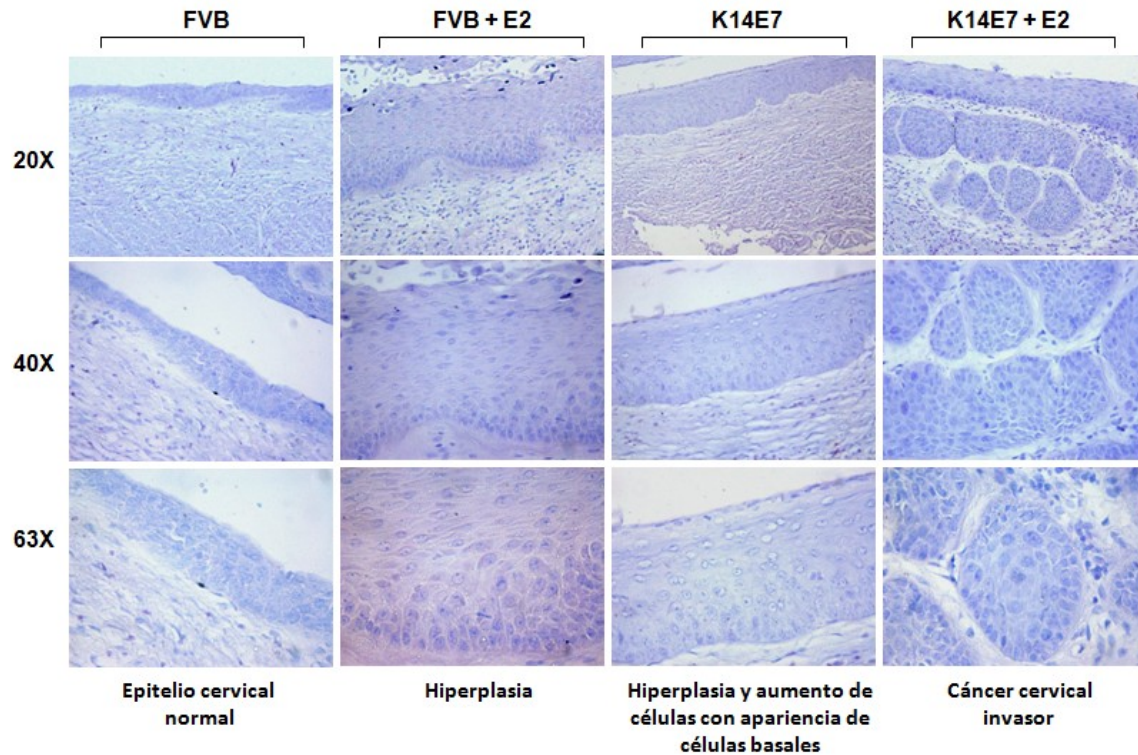
## VIII.RESULTADOS

Se detectó la presencia del transgén de E7 en los ratones transgénicos de los que se obtuvieron las muestras de lavado vaginal y copro para este proyecto. La PCR de los ORFs E6-E7 y la posterior digestión con la enzima HpaI, mostraron que los ratones K14E7 presentan el transgén de interés. Estas pruebas forman parte de un proyecto en paralelo del laboratorio de “Oncología Molecular” del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV D.F.



*Vazquez-Hernandez, et al.; manuscript in preparation*

**Fig. 6** Detección del transgén de E6-E7 por PCR. A) Diagrama ilustrativo para ejemplificar la posición del terminador de la traducción en el ORF del gen E7 y E6 en ratones HPV16K14E6 y E7 respectivamente y sitio de corte de la enzima HpaI. B) Electroforesis de productos de PCR de región E6 y E7 con y sin tratamiento con enzima HpaI; carriles 1 y 2 ratón K14E6 sin tratamiento y con tratamiento enzimático respectivamente, carriles 3 y 4 ratón K14E7 con y sin tratamiento enzimático respectivamente, carril 5 marcador de tamaño molecular.



**Fig. 7** Cortes de cérvix de ratones transgénicos y no transgénicos con siete meses de edad equivalentes a seis meses de tratamiento con  $17\beta$ -estradiol. Técnica de tinción Hematoxilina-Eosina, observación en microscopio óptico a diferentes aumentos (20X-63X).

Las observaciones al microscopio mostraron que se presentaron las lesiones características de CaCu en los ratones K14E7 con siete meses de edad, cuando se trataron con  $17\beta$ -estradiol. En las laminillas correspondientes a los ratones FVB, que no reciben tratamiento, se puede observar la arquitectura normal del tejido cervical, que es un epitelio estratificado con células diferenciadas; cuando se compara con el tejido de ratones K14E7 con tratamiento (K14E7+E2), se observa la pérdida de la estructura normal del epitelio así como la presencia de células con núcleos grandes, algunas células presentan dos núcleos. A pesar de que los ratones FVB fueron sometidos al tratamiento con  $17\beta$ -estradiol, solo se observó hiperplasia del tejido semejante a los ratones transgénicos que no recibieron tratamiento hormonal.

Para el análisis metagenómico de la diversidad bacteriana se colectaron volúmenes aproximados a 20 $\mu$ L de lavado vaginal así como píldoras de copro de un promedio de 5 a 8 ratones de cada tratamiento de acuerdo al siguiente esquema.

Característica	Edad del ratón (meses)						
	1	2	3	4	5	6	7
FVB(-E2)	1	2	3	4	5	6	7
FVB (+E2)	1	2	3	5	5	6	7
E7(-E2)	1	2	3	5	5	6	7
E7 (+E2)	1	2	3	5	5	6	7

FVB = Ratón no transgénico. E7= Ratón transgénico (+E2)= Aplicación de tratamiento con comprimidos de 17 $\beta$ -estradiol. (-E2)= Sin aplicación de tratamiento.

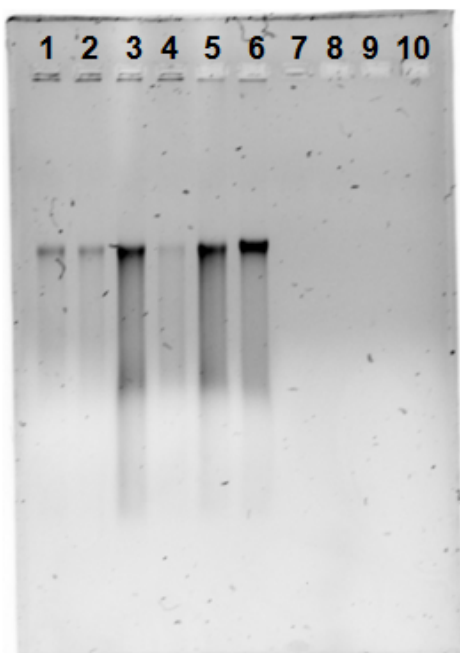
Las muestras de lavado vaginal correspondientes al mismo tratamiento se homogenizaron y mezclaron para obtener una muestra de mayor volumen. Las muestras de copro se procesaron de forma individual para cada tratamiento.

Los ácidos nucleicos extraídos se identificaron con la clave que indicaba el tipo de ratón: FVB (no transgénico), E7 (transgénico); la aplicación de tratamiento con 17  $\beta$ -estradiol: -E2 (sin tratamiento), +E2 (tratamiento) así como la edad del ratón en meses. Para las muestras de copro se utilizó el mismo sistema de identificación, añadiendo al final un número consecutivo.

Después de la extracción de DNA total a partir de las muestras de lavado vaginal y de copro se determinó la concentración en ng/ $\mu$ L y el coeficiente  $A_{260/280}$  del ácido nucleico obtenido (Tabla 6) y se llevó a cabo el corrimiento electroforético para verificar la integridad del DNA (Figura 8).

Tabla. 6 Concentraciones de DNA en muestras de lavado vaginal de ratones, determinadas con el equipo NanoDrop lite.

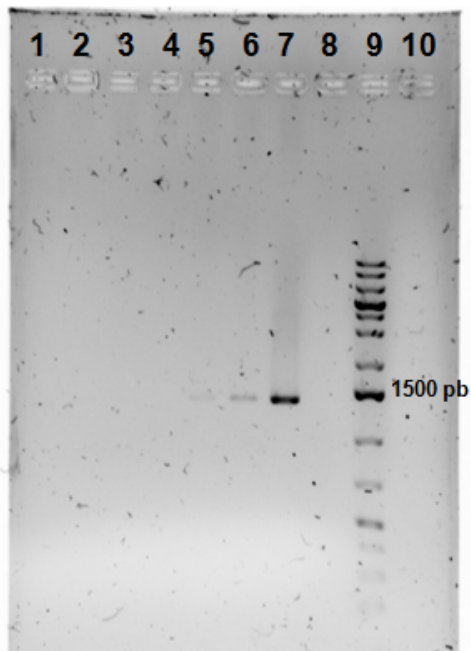
MUESTRA	$A_{260}$	$A_{260/280}$	Concentración (ng/ $\mu$ L)
FV(-E2)1m	0.425	1.86	21.3
FVB(+E2)1m	0.158	1.78	7.9
E7(-E2)1m	0.155	1.84	7.7
E7(+E2)1m	0.189	1.71	9.4



Carril	Muestra	Concentración ng/ $\mu$ L
1	FVB(-E2)2m1	38.3
2	FVB(-E2)2m2	18.3
3	FVB(-E2)2m3	131.2
4	FVB(-E2)2m4	27.3
5	FVB(-E2)2m5	83.5
6	FVB(-E2)2m6	56.8

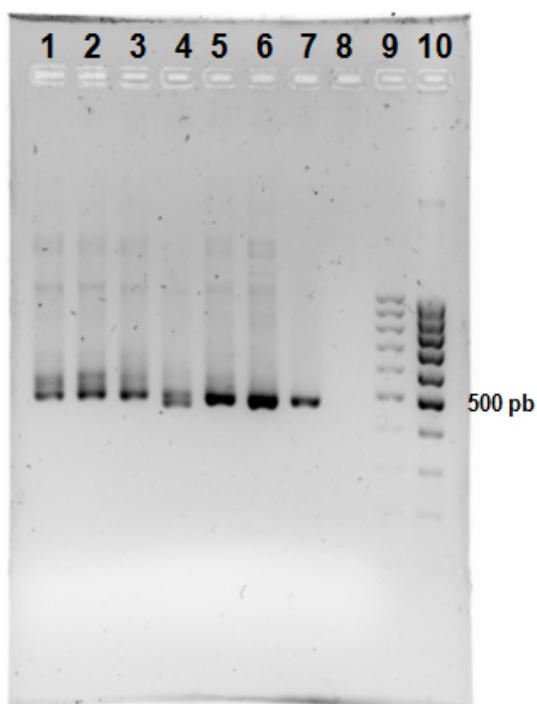
**Fig. 8** Fraccionamiento electroforético de ácidos nucleicos. Las muestras de copro corresponden a ratones no transgénicos sin tratamiento con dos meses de edad. Gel de agarosa al 0.5 % teñido con 0.7  $\mu$ L de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 100 V/35 min. Cada pozo se cargó con 2  $\mu$ L de muestra, 1  $\mu$ L de buffer 6X y 4  $\mu$ L de agua-PCR. En la tabla se describen las muestras de copro en cada carril, así como la concentración de DNA determinada con el equipo NanoDrop Lite.

Se utilizó como molde el DNA obtenido de las muestras de lavado vaginal para llevar a cabo la PCR anidada. En una primera reacción se utilizaron los iniciadores FBac – CGO 605R (Figura 9). A pesar de que no se observaron bandas con un tamaño cercano a 1500pb, estos productos de PCR se utilizaron como molde para llevar a cabo la segunda PCR con el par de iniciadores CGO465, obteniendo fragmentos con un tamaño aproximado a 500pb (Figura 10).



Carril	Muestra
1	E7TX4m
2	E7TX3m
3	FVBCTL4m
4	E7CTL5m
5	FVBTX3m
6	FVBCTL1m
7	<i>E. coli</i> SK10019 (+)
8	Control sin molde (-)
9	Marcador 1Kb

**Fig. 9** Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando iniciadores FBac – CGO 605R. Gel de agarosa al 1.0% teñido con 0.7  $\mu$ L de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 100V /50min. Cada pozo se cargó con 6 $\mu$ L de muestra, 1  $\mu$ L de buffer 6X. En la tabla se describen las muestras de lavado vaginal en cada carril, así como el uso de controles positivo, negativo y marcador de peso molecular.

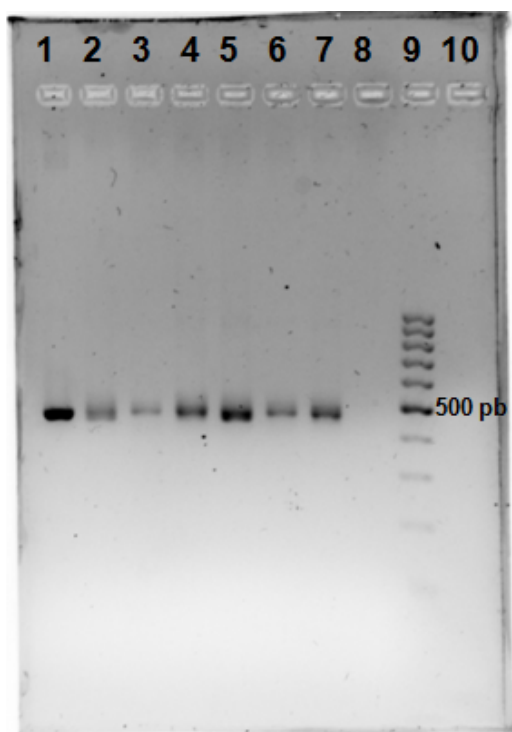


Carril	Muestra
1	E7TX4m
2	E7TX3m
3	FVBCTL4m
4	E7CTL5m
5	FVBTX3m
6	FVBCTL1m
7	<i>E. coli</i> SK10019 (+)
8	Control sin molde (-)
9	Marcador 100pb
10	Marcador 100pb

**Fig. 10** Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando iniciadores CGO 465, PCR anidada. Gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.7  $\mu$ L de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 100V /50min. Cada pozo se cargó con 6 $\mu$ L de muestra, 1  $\mu$ L de buffer 6X. En la tabla se describen las muestras de lavado vaginal en cada carril, así como el uso de controles positivo, negativo y marcador de peso molecular.



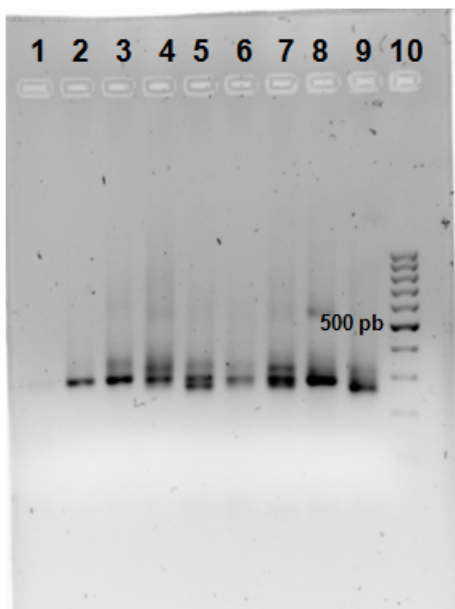
El DNA extraído de las muestras de copro se utilizó como molde para la PCR utilizando los pares de iniciadores CGO 465; se obtuvieron amplicones con un tamaño aproximado a 500 pb (Figura 11).



Carril	Muestra
1	<i>E. coli</i> SK10019 ( + )
2	FVBCTL7m 1
3	FVBCTL7m 2
4	FVBCTL7m 3
5	FVBCTL7m 4
6	FVBCTL7m 5
7	FVBCTL7m 6
8	Control sin molde ( - )
9	Marcador 100pb

**Fig. 11** Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando iniciadores CGO 465. Gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.7 mL de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 100V /50min. Cada pozo se cargó con 6 $\mu$ L de muestra, 1  $\mu$ L de buffer 6X. En la tabla se describen las muestras de copro en cada carril, así como el uso de controles positivo, negativo y marcador de peso molecular.

Cuando se determinó la presencia de DNA de origen bacteriano, se llevó a cabo la preparación de las genotecas de la región V3 del rDNA 16S por PCR insertando secuencias útiles para la secuenciación masiva así como un “barcode” diferente a cada muestra, con esta reacción se obtuvieron productos de PCR con un tamaño cercano a 300pb (Figura 12).



Carril	Muestra	No. Barcode
1	Control sin molde (-)	F23
2	<i>E. coli</i> SK10019 (+)	F23
3	FVB(-E2)5m	F17
4	FVB(+E2)5m	F18
5	E7(-E2)5m	F19
6	E7(+E2)5m	F20
7	FVB(-E2)6m	F21
8	FVB(+E2)6m	F22
9	E7(-E2)6m	F23
10	Marcador 100pb	N/A

**Fig. 12** Fraccionamiento electroforético de productos de PCR utilizando iniciadores V3 341F – V3 518R. Gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.7  $\mu$ L de colorante Midori Green advanced (1:15); electroforesis a 100V /50min. Cada pozo se cargó con 5 $\mu$ L de muestra, 1  $\mu$ L de buffer 6X y 1  $\mu$ L de Agua grado PCR. En la tabla se describen las muestras de lavado vaginal en cada carril, así como el uso de controles positivo y negativo, marcador de peso molecular y el número de “barcode” colocado a cada muestra.

Se llevaron a cabo réplicas de las reacciones de PCR de cada muestra con “barcode”, estos productos se mezclaron para obtener un mayor volumen de muestra.

Para obtener el “pool” para secuenciación de las genotecas de lavado vaginal y de copro, se mezclaron los volúmenes necesarios de cada muestra con “barcode” para tener una concentración aproximada de 10  $\mu$ g de producto de PCR (Tablas 7 y 8).

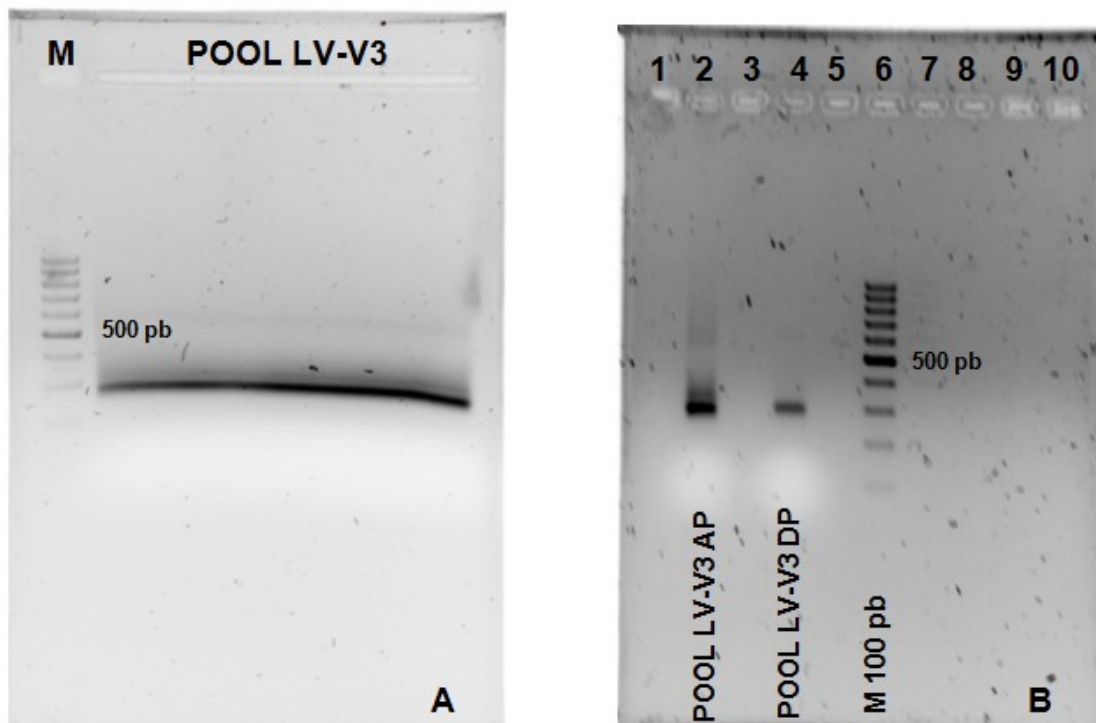
Se llevó a cabo la electroforesis de la mezcla en gel preparativo, se cortó la banda con el tamaño cercano a 300pb y se purificó el producto de PCR, se llevó a cabo el fraccionamiento electroforético en gel analítico de agarosa al 2.0 % y se comprobó que el tamaño del producto purificado fuera aproximado a 300pb (Figura 13).

Tabla 7. Volúmenes utilizados de cada genoteca de lavado vaginal para preparar el “pool” para secuenciación masiva.

<b>Muestra</b>	<b>“Barcode”</b>	<b>A<sub>260</sub></b>	<b>A<sub>260/280</sub></b>	<b>Concentración (ng/μL)</b>	<b>Volumen para 10μg (μL)</b>
FVB(-E2)1m	F-01	8.259	1.41	413.0	24
FVB(+E2)1m	F-02	5.982	1.42	299.1	33
E7(-E2)1m	F-03	11.326	1.40	566.3	18
E7(+E2)1m	F-04	7.323	1.43	366.1	27
FVB(-E2)2m	F-05	8.460	1.39	423.0	24
FVB(+E2)2m	F-06	6.948	1.40	347.4	29
E7(-E2)2m	F-07	8.120	1.46	406.0	25
E7(+E2)2m	F-08	10.676	1.34	533.8	19
FVB(-E2)3m	F-09	9.269	1.81	463.4	22
FVB(+E2)3m	F-10	9.340	1.84	467.0	21
E7(-E2)3m	F-11	8.475	1.82	423.8	24
E7(+E2)3m	F-12	10.438	1.85	521.9	19
FVB(-E2)4m	F-13	10.594	1.49	529.7	19
FVB(+E2)4m	F-14	9.789	1.52	489.4	20
E7(-E2)4m	F-15	10.708	1.49	535.4	19
E7(+E2)4m	F-16	9.955	1.51	497.8	20
FVB(-E2)5m	F-17	8.879	1.49	444.0	23
FVB(+E2)5m	F-18	9.337	1.49	466.8	21
E7(-E2)5m	F-19	9.584	1.49	479.2	21
E7(+E2)5m	F-20	9.442	1.47	472.1	21
FVB(-E2)6m	F-21	8.634	1.43	431.7	23
FVB(+E2)6m	F-22	9.482	1.44	474.1	21
E7(-E2)6m	F-23	7.764	1.45	388.2	26
E7(+E2)6m	F-24	7.772	1.46	388.6	26
FVB(-E2)7m	F-25	9.285	1.43	464.2	22
FVB(+E2)7m	F-26	8.451	1.46	422.5	24
E7(-E2)7m	F-27	11.121	1.33	556.1	18
E7(+E2)7m	F-28	8.107	1.45	405.3	25

Tabla 8. Volúmenes utilizados de cada genoteca de copro para preparar el “pool” para secuenciación masiva.

Muestra	“Barcode”	A <sub>260</sub>	A <sub>260/280</sub>	Concentración (ng/μL)	Volumen para 10μg. (μL)
FVB(-E2)1m	F-29	11.066	1.60	553.3	18
FVB(+E2)1m	F-02	11.179	1.60	559.0	18
E7(-E2)1m	F-03	7.365	1.44	368.2	27
E7(+E2)1m	F-04	12.499	1.59	624.9	16
FVB(-E2)2m	F-05	12.048	1.54	602.4	17
FVB(+E2)2m	F-06	8.226	1.50	411.3	24
E7(-E2)2m	F-07	8.138	1.41	406.9	25
E7(+E2)2m	F-08	9.176	1.49	458.8	22
FVB(-E2)3m	F-09	9.302	1.50	465.1	22
FVB(+E2)3m	F-10	9.040	1.50	452.0	22
E7(-E2)3m	F-11	8.893	1.50	444.7	22
E7(+E2)3m	F-12	10.174	1.55	508.7	20
FVB(-E2)4m	F-13	9.876	1.46	493.8	20
FVB(+E2)4m	F-14	8.911	1.46	445.5	22
E7(-E2)4m	F-15	8.975	1.48	448.8	22
E7(+E2)4m	F-16	7.577	1.47	378.9	26
FVB(-E2)5m	F-17	8.604	1.48	430.2	23
E7(-E2)5m	F-19	7.393	1.51	369.6	27
E7(+E2)5m	F-18	8.214	1.45	410.7	24
FVB(-E2)6m	F-21	8.267	1.45	413.3	24
FVB(+E2)6m	F-22	8.346	1.44	417.3	24
E7(-E2)6m	F-23	8.278	1.44	413.9	24
E7(+E2)6m	F-24	8.185	1.46	409.3	24
FVB(-E2)7m	F-25	8.276	1.43	413.8	24
FVB(+E2)7m	F-26	7.462	1.44	373.1	27
E7(-E2)7m	F-27	7.882	1.45	394.1	25
E7(+E2)7m	F-28	6.963	1.45	348.1	29



**Fig. 13** Preparación de genotecas V3 de rDNA 16S. **A.** Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 2%, se observa el tamaño cercano a 300 pb en la mezcla de las muestras (POOL LV-V3), comparando con el marcador 100 pb (M). **B.** Fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 2% comparando el tamaño de los productos antes y después de purificar. Carril 2 mezcla antes de purificar, carril 4 mezcla después de purificar, carril 6 marcador 100 pb.

Después de obtener el producto purificado de la genoteca se determinó la concentración de DNA de las muestras (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración de DNA en genotecas de lavado vaginal y copro utilizadas en la secuenciación masiva.

<b>Genoteca</b>	<b>Concentración (ng/μL)</b>
<b>LV-V3</b>	12.8
<b>CO-BT</b>	12.6

Después de que se determinó la concentración de DNA final de las genotecas, éstas fueron entregadas para llevar a cabo la secuenciación masiva, las muestras se sometieron a análisis de calidad previos al acondicionamiento para llevar a

cabo la secuenciación y finalmente se cargó el chip para el análisis en el equipo PGM Ion Torrent.

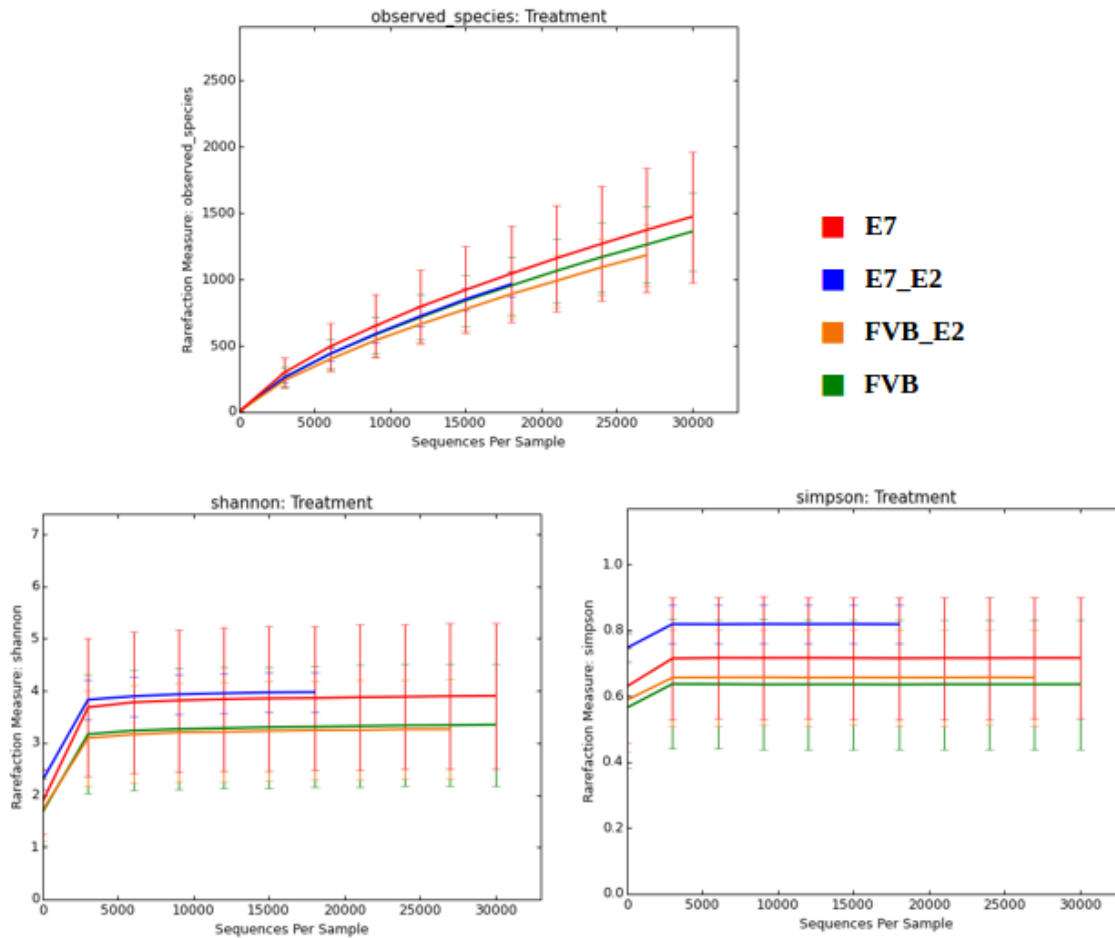
Utilizando el “software Torrent Suite v4.4.3” se obtuvieron un total de 2, 501,101 lecturas con un tamaño promedio de 173 pb para las muestras de lavado de tracto reproductivo, mientras que para las muestras de copro se obtuvieron 3, 395,289 lecturas con un tamaño promedio de 173 pb. Se asignaron las lecturas a la muestra de origen por medio del “barcode” y las lecturas que no cumplieron con estándares de calidad establecidos fueron excluidas del análisis.

Las lecturas contenidas en archivos FASTA, se analizaron en QIIME v1.9.0. Las secuencias se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) y se llevó a cabo la clasificación taxonómica de OTUs representativos.

Se llevó a cabo el cálculo de la distancia filogenética, diversidad alfa y diversidad beta. Entre los análisis de la diversidad alfa se incluyeron el índice de Shannon y de Simpson que se clasifican como índices de diversidad específica (Fig. 14).

De acuerdo con el análisis de rarefacción de las especies observadas en cada tratamiento, se observa que las muestras de los grupos que no reciben tratamiento con estradiol presentan mayor diversidad, en ambos tipos de ratones FVB, E7 comparados con los grupos que reciben el tratamiento.

Cuando se observa el índice de Shannon, las muestras de los grupos de ratones E7 presentan mayor riqueza y uniformidad en comparación con el grupo de ratones FVB que recibe el mismo tratamiento; y cuando se observa que el índice de Simpson, este toma un valor cercano a uno por lo que muestra la alta probabilidad de que dos sujetos tomados al azar pertenezcan a la misma especie, reflejando la baja diversidad de especies en la muestra de ratones E7 que reciben o no tratamiento.



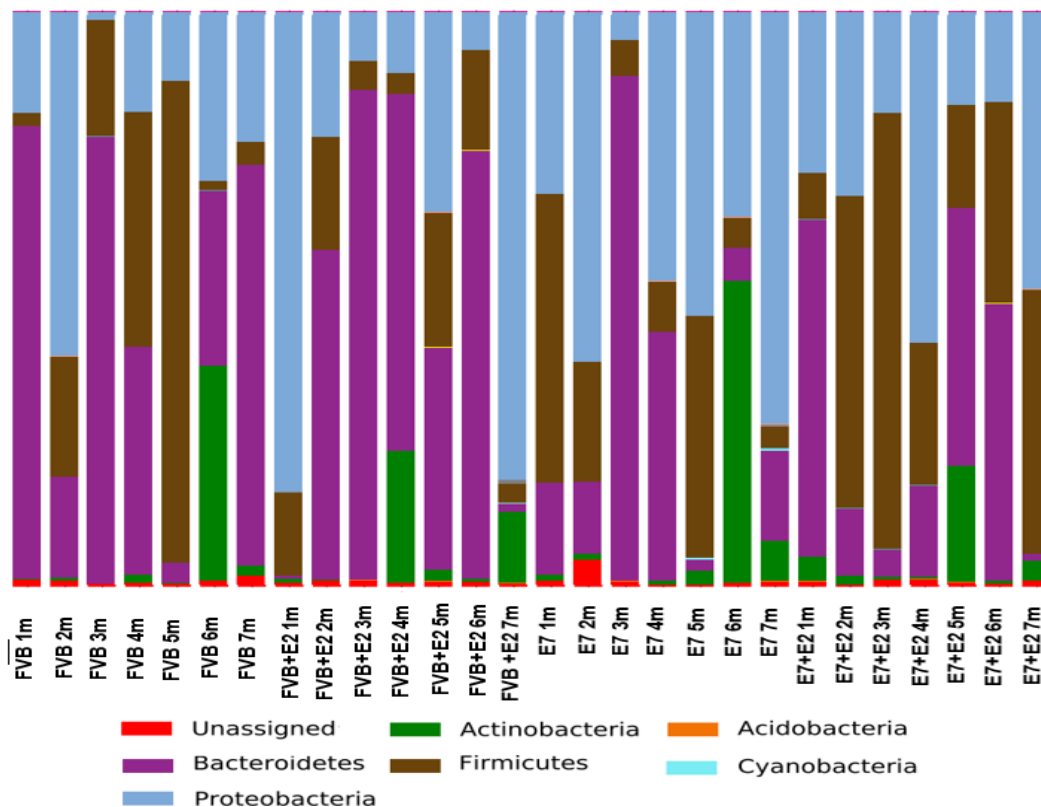
**Fig.14** Parámetros de diversidad alfa calculados a partir de la tabla de OTUs de las muestras de lavado vaginal, agrupadas por tratamiento. Se seleccionaron 30000 secuencias y se calcularon los índices de Shannon y Simpson, las líneas representan la media y las barras de error la desviación estándar.

Cuando se compararon los OTUs generados contra la base de datos de Green genes, se obtuvieron gráficos de la abundancia relativa de microorganismos encontrados en las distintas muestras a los seis niveles taxonómicos: Reino, Fila, Clase, Orden, Familia y Género.

En la figura 15 se observa la abundancia relativa en porcentaje de los fila identificados en las muestras de lavado vaginal, estos fila fueron Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria en mayor porcentaje, también se identificaron los fila Acidobacteria y Cyanobacteria en porcentajes menores.

Se llevó a cabo una prueba de U Mann-Whitney para determinar si existe diferencia en el porcentaje de abundancia relativa de los diferentes fila y géneros

identificados en cada grupo. De acuerdo a este análisis la media de porcentaje de Firmicutes en el grupo FVB(+E2) (0.1449) y el grupo E7(+E2) (0.3485) fueron estadísticamente diferentes  $p= 0.025$  mostrando que el cambio en abundancia de este filum que se observa en el grupo de ratones que desarrollan cáncer no es efecto directo del tratamiento con  $17\beta$  estradiol sino un posible efecto mediado por E7.

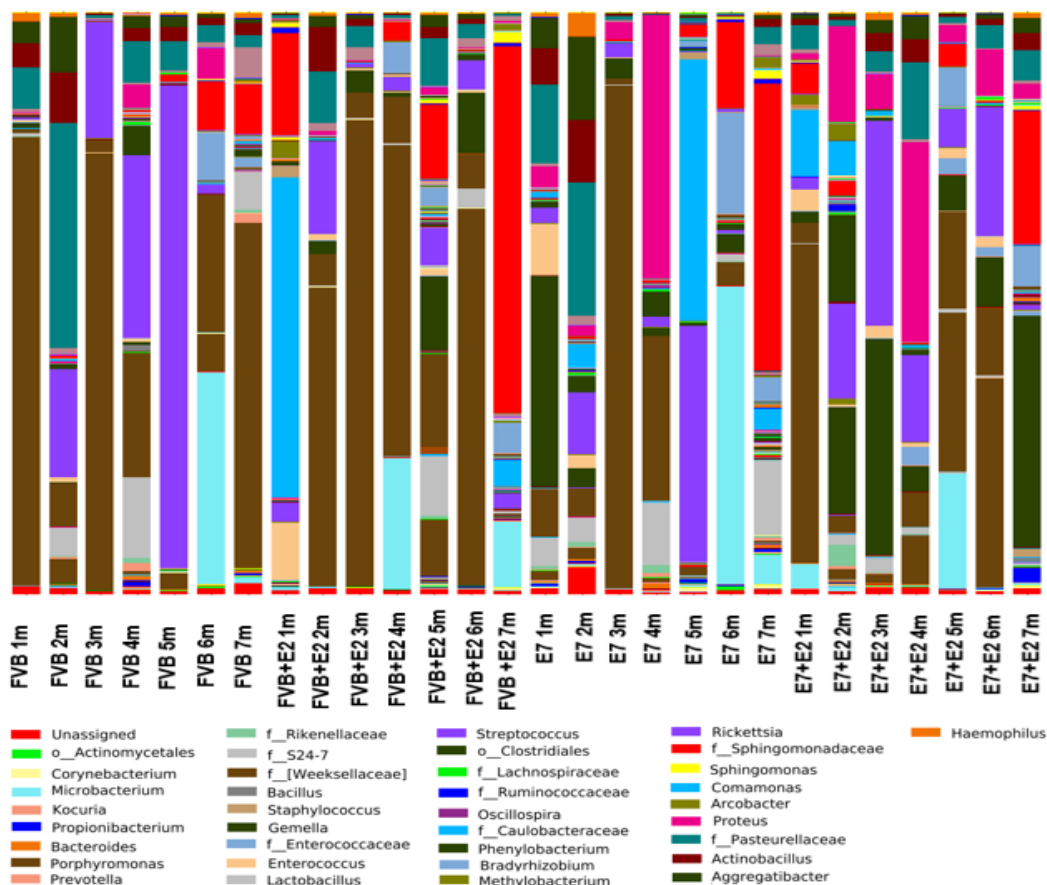


**Fig.15** Abundancia relativa de microorganismos a nivel de filum en las muestras de lavado vaginal colectadas de cada grupo de ratones en las diferentes edades.

Cuando se observan los microorganismos identificados a nivel de género (Fig. 16) se muestra que la microbiota de los ratones varía con respecto a la edad así como con el tipo de ratón y el tratamiento que tengan, de forma general se puede observar que el porcentaje de abundancia relativa de microorganismos del género *Porphyromonas* sp. disminuye en las muestras de ratones E7(+E2) cuando se compara con las muestras de ratones FVB(+E2), sin embargo, las medias (0.5139)



y (0.0847) respectivamente, no muestran diferencia estadísticamente significativa  $p=0.4433$ .



**Fig.16** Abundancia relativa de microorganismos a nivel de género en las muestras de lavado vaginal de cada grupo de ratones en las diferentes edades.

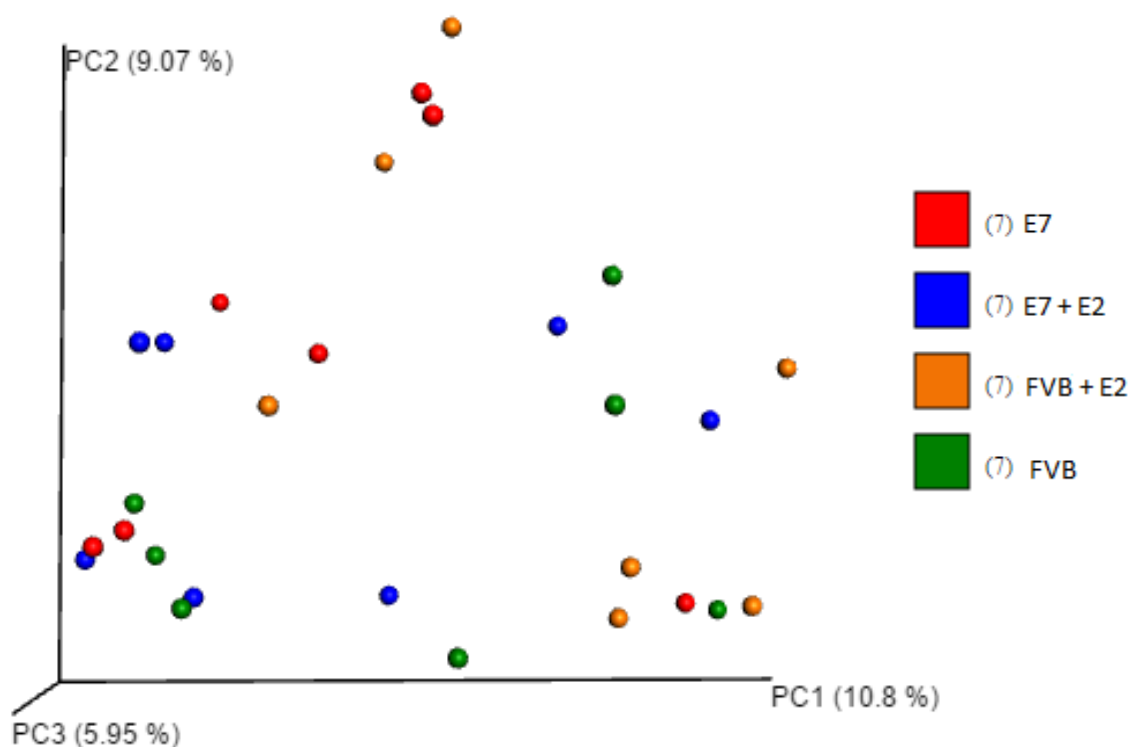
Esta prueba se llevó a cabo en los géneros que destacaron al observar la gráfica de abundancia relativa, los géneros analizados fueron *Streptococcus* sp. *Proteus* sp. *Propionibacterium* sp *Gemella* sp, así como las familias Sphingomonadaceae y Pasteurellaceae.

Con respecto al género *Gemella* sp. Se observó que las medias de las muestras correspondientes a los grupos FVB(-E2) (0.0010) y E7(+E2) (0.0857) son diferentes  $p=0.0022$ , esta diferencia estadísticamente significativa también se observó al comparar las medias de los grupos E7(-E2) (0.0314) y E7(+E2)

(0.0857)  $p=0.0409$ , mostrando que esta variación está relacionada con la presencia de 17  $\beta$ -estradiol.

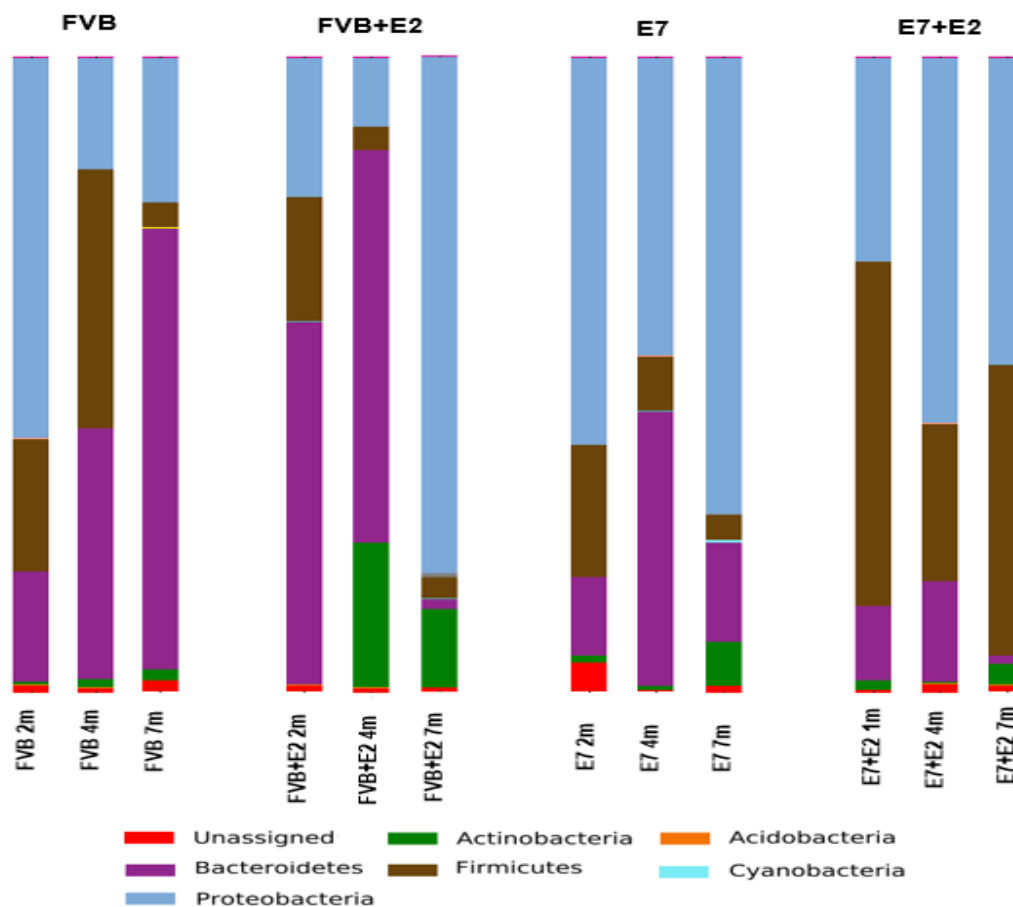
En el caso del género *Proteus* sp. se obtuvo diferencia en las medias de los grupos E7(+E2) (0.0590) y FVB(+E2) (0.0033)  $p=0.0033$  y los grupos E7(+E2) (0.0590) FVB(-E2) (0.0021)  $p= 0.0215$ , mostrando que esta diferencia es independiente a la aplicación del tratamiento.

Con el análisis de la diversidad beta por análisis de coordenados principales, tomando los datos de cada grupo de ratón desde el primero hasta el séptimo mes de tratamiento, se puede observar que las muestras de lavado correspondientes a los ratones que desarrollan cáncer E7(+E2) son diferentes de las muestras del grupo FVB(+E2) al no agruparse con éstas, como se agrupa con las muestras del grupo (E7), además las muestras del grupo E7(+E2) se encuentran más cercanas a las del grupo (FVB), sin embargo las muestras de este grupo E7(+E2) no presentan un patrón para agruparse, sugiriendo de forma general que no hay una distribución característica para los cuatro grupos (Fig. 17).

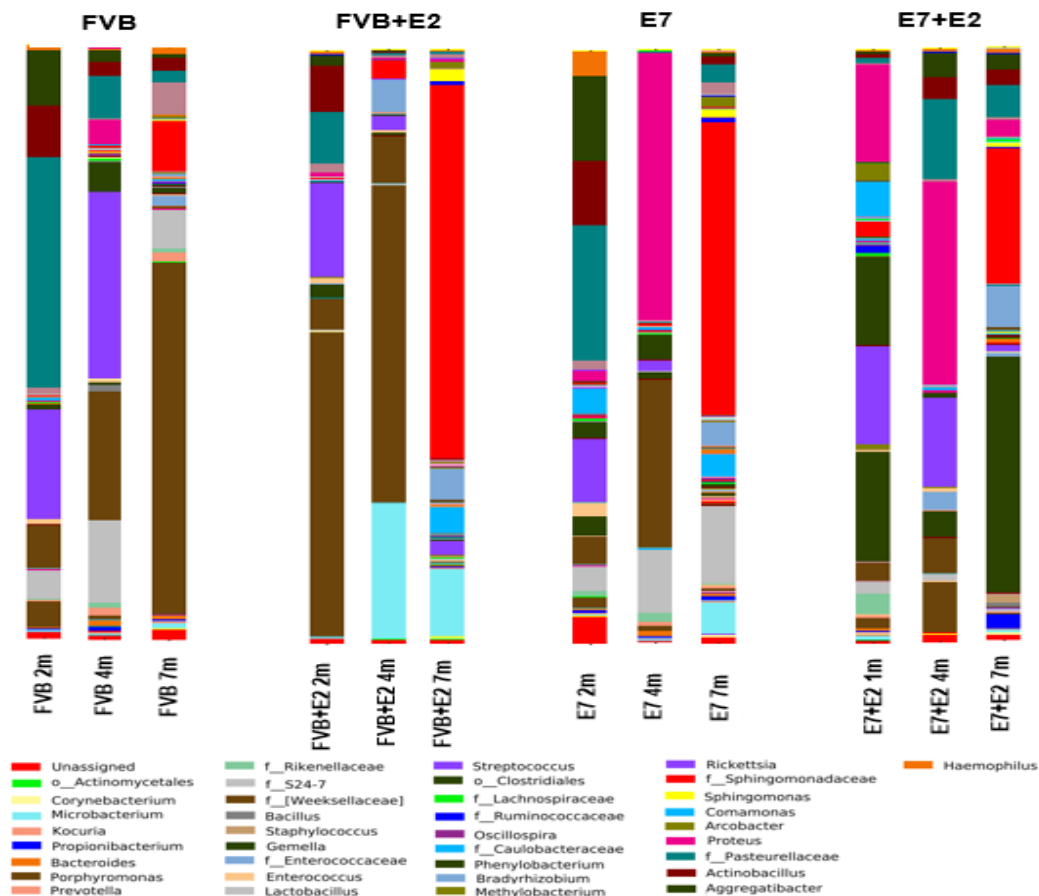


**Fig. 17** Gráfico de análisis de coordenados principales (PCoA) de las muestras de lavado agrupadas por tratamiento.

Se tomaron los meses 2, 4 y 7 de edad equivalentes a los meses 1, 3 y 6 de tratamiento de cada grupo de ratones, es en estas edades donde se caracterizó la etapa del ciclo estral de los ratones y se estableció que se encontraban en estro, esta característica permitió dar mayor uniformidad a las muestras en cuanto a la influencia de las hormonas en la diversidad de la microbiota.



**Fig.18** Abundancia relativa de microorganismos identificados a nivel de filum a un mes, tres meses y seis meses de tratamiento (2, 4 y 7 meses de edad).



**Fig.19** Abundancia relativa de microorganismos identificados a nivel de género a un mes, tres meses y seis meses de tratamiento (2, 4 y 7 meses de edad).

Revisando los resultados de la abundancia relativa de cada grupo por edad a nivel de fila y a nivel de género (Fig. 18 y Fig. 19), podemos observar que:

En el grupo E7(+E2) de siete meses de edad se registró un aumento en la abundancia relativa de microorganismos del género *Gemella* sp. (banda color verde militar). Este aumento no se observa en los ratones control de la misma edad que reciben el tratamiento FVB(+E2), sugiriendo que este efecto puede ser inducido por E7 y no por el tratamiento con estrógeno.

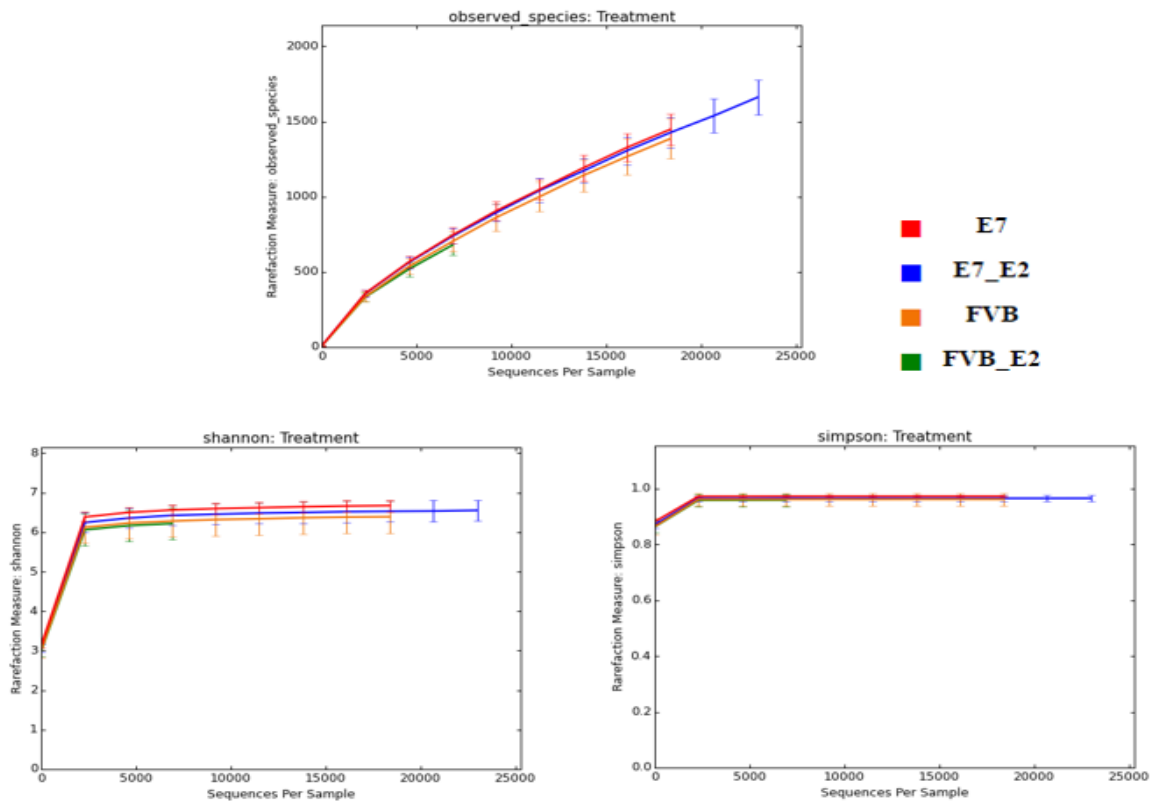
En los ratones que reciben tratamiento con estradiol así como los transgénicos E7(-E2), todos de 7 meses de edad, se observa un aumento en el porcentaje relativo de organismos de la familia Sphingomonadaceae (color rojo) FVB(+E2)

(62.91%), E7(-E2) (49.35%), E7(+E2) (22.84%), esta familia se observa en menor porcentaje en los ratones control que no reciben tratamiento FVB(-E2) (17.54%).

Se observa también mayor porcentaje de abundancia relativa en microorganismos del género *Proteus* sp (color rosa) en los ratones E7(+E2) (16.42%) con 2 meses de edad cuando se compara con los controles E7(-E2) (1.74%), FVB (0.21%) y FVB(+E2) (0.81%). De igual forma se observa que en los grupos de ratones FVB(+E2), E7(-E2) y E7(+E2) el porcentaje relativo de *Porphyromonas* sp. (banda café) disminuye en los ratones correspondientes a los 7 meses de edad (0.4%), (0.4%), (0.3%), cuando se comparan con el grupo de ratones FVB(-E2) (59.26%).

En el grupo de ratones E7(+E2) con siete meses de edad, se observa un aumento en el porcentaje de abundancia relativa de microorganismos del género *Propionibacterium* sp (banda azul) 2.31%. mientras que en los otros grupos se observan porcentajes menores FVB(-E2) (0.20%), FVB(+E2) (0.33%), E7(-E2) (0.57%). A pesar de que se observan cambios en la abundancia relativa de microorganismos de diferentes géneros en el grupo de ratones que desarrollan cáncer y estos cambios se observan sólo en este grupo de ratones, el análisis de las medias no presenta diferencia estadísticamente significativa cuando se compara la media del grupo E7(+E2) con las medias de los otros grupos.

Los resultados de las muestras de copro se analizaron de forma semejante a las muestras de lavado observando los índices de diversidad alfa (Fig.20). Se seleccionaron un total de 23000 lecturas para el cálculo de rarefacción y de índices de diversidad alfa, el gráfico de diversidad de las muestras agrupadas por tratamiento muestra que la diversidad de especies es semejante en los cuatro grupos. Cuando se observa el índice de Shannon las muestras presentan valores de riqueza y uniformidad semejantes. El índice de Simpson, toma un valor cercano a 1, por lo que muestra la alta probabilidad de que dos sujetos tomados al azar pertenezcan a la misma especie, reflejado la baja diversidad de especies en las muestras.

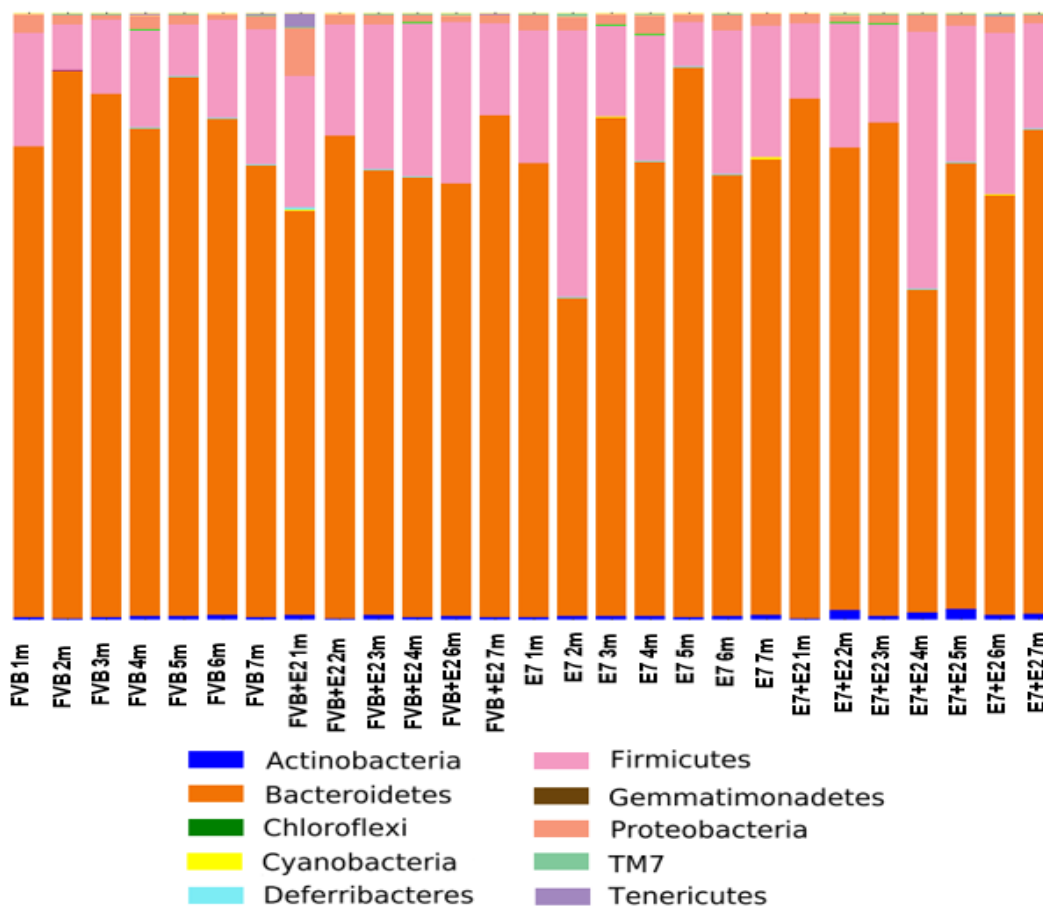


**Fig.20** Parámetros de diversidad alfa calculados a partir de la tabla de OTUs de las muestras de copro, agrupadas por tratamiento. Se seleccionaron 23000 secuencias y se calcularon los índices de Shannon y Simpson, las líneas representan la media y las barras de error la desviación estándar.

Cuando se analizó la abundancia relativa de microorganismos presentes en cada muestra se pudo observar que los filia identificados fueron Bacteroidetes en mayor porcentaje (>50%) seguido del filum Firmicutes, Proteobacteria y finalmente Actinobacteria; se identificaron también, en menor porcentaje, microorganismos pertenecientes a los filia Cyanobacteria, Deferribacteres, TM7 y Tenericutes en porcentajes menores (Fig.21). No se incluyen las muestras correspondientes al grupo FVB(+E2) con cinco meses de edad ya que esas muestras no se pudieron obtener.

Cuando se compararon las medias de los porcentajes de abundancia relativa de cada grupo de ratones, desde el primero hasta el séptimo mes de edad, se pudo observar que en el caso del filum Tenericutes las medias de los grupos FVB(+E2)

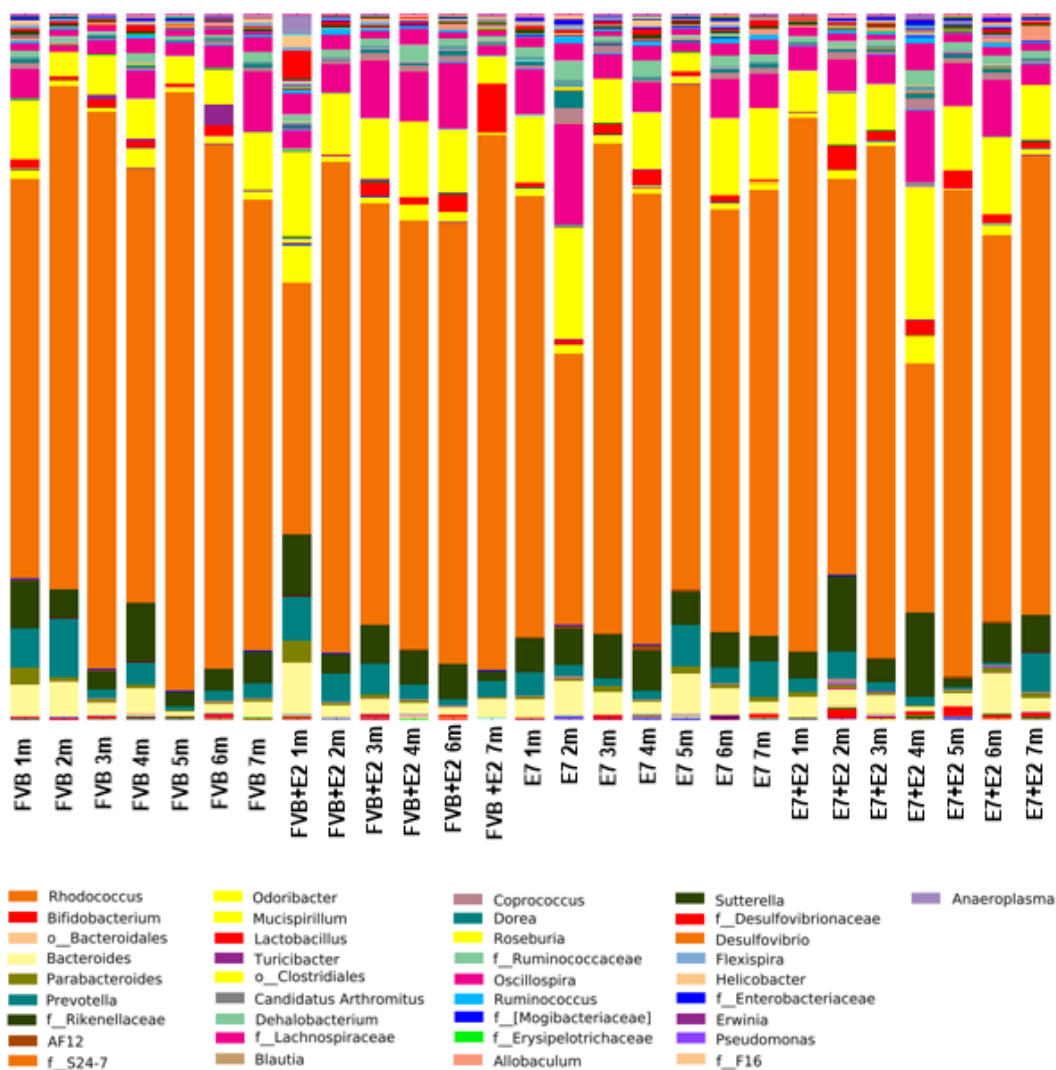
(0.00087) y E7(+E2) (0.00040) tienen una diferencia estadísticamente significativa  $p= 0.0383$ .



**Fig.21** Abundancia relativa de microorganismos a nivel de filum en las muestras de copro colectadas de cada grupo de ratones a diferentes edades. Cada barra representa un grupo de ratones y la abundancia se representa en porcentaje de un total de 100%.

Al analizar los datos a nivel de género se puede observar que en las muestras existe predominancia de microorganismos de la familia S24-7, además se pudieron identificar otros géneros como *Prevotella* sp, *Parabacteroides* sp, *Bacteroides* sp, *Lactobacillus* sp, *Odoribacter* sp, *Coprococcus* sp, *Dorea* sp, *Oscillispira* sp, *Ruminococcus* sp, entre otros (Fig.22).

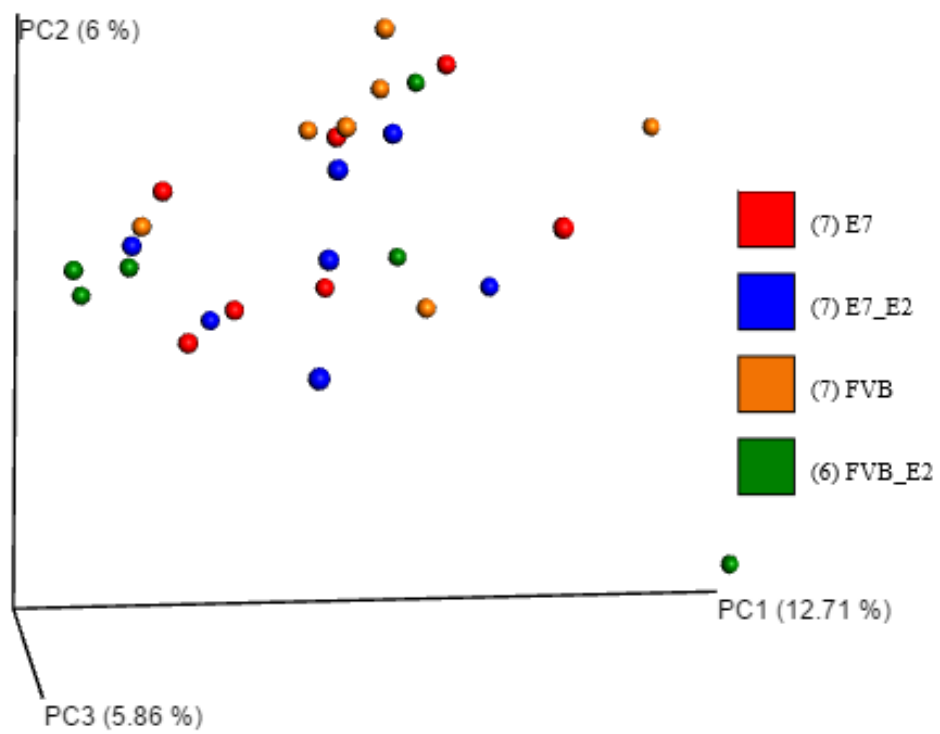
Cuando se compararon las medias de los géneros identificados en los distintos grupos no se observó alguna diferencia estadísticamente significativa.



**Fig.22** Abundancia relativa de microorganismos a nivel de género en las muestras de copro colectadas de cada grupo de ratones a diferentes edades.

Al revisar los resultados del análisis de la diversidad beta por análisis de coordinados principales (PCoA) de las muestras correspondientes a todas las edades de los ratones de las cuatro condiciones estudiadas, se puede ver que las muestras correspondientes al grupo E7(+E2) no son muy diferentes a las muestras de los otro grupos, no se observa que las muestras, correspondientes a este grupo, se concentren de manera particular (Figura 23).





**Fig. 23** Gráfico de análisis de coordenados principales (PCoA) de las muestras de copro agrupadas por tratamiento.

## IX.DISCUSIÓN

### **Microbiota del tracto reproductivo.**

Actualmente son pocos los estudios sobre la microbiota del tracto reproductivo de roedores, en este caso ratones, sin embargo existen estudios sobre esta microbiota en otro tipo de roedores. A pesar de esto no existe un análisis semejante en el modelo de estudio utilizado durante este trabajo. Noguchi y colaboradores en el 2003 mencionan que puede existir variación de microorganismos de la vagina en cepas diferentes a las de los animales que se utilizan en un laboratorio.

Es importante mencionar que las muestras que se utilizaron en este estudio no se obtuvieron de forma seriada, es decir, no se pudo llevar el seguimiento del mismo ratón desde el primer mes de edad hasta el séptimo mes de edad, debido a que los ratones fueron sacrificados en edades específicas para llevar a cabo ensayos correspondientes a otros estudios; a pesar de esto se pudieron obtener resultados significativos.

Los fila de microorganismos identificados en las muestras de lavado vaginal de ratones FVB y E7 con y sin tratamiento (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria), son similares a los fila descritos en el estudio realizado por MacManes en el 2011 en donde se caracterizó la microbiota del tracto reproductivo de roedores de la especie *Peromyscus californicus*, los fila que MacManes identificó fueron Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria.

Por otra parte Barfod y colaboradores en el 2013, quienes llevaron a cabo la identificación de microorganismos en muestras de pulmones, lavado vaginal y el ciego de ratones de la cepa BALB/cJ, lograron caracterizar los microorganismos presentes en muestras de lavado vaginal en donde se identificaron además de los fila descritos por MacManes, los fila Fusobacteria y Cyanobacteria; sin embargo en las muestras de los ratones FVB y E7 bajo distintos tratamientos se identificaron estos fila en bajo porcentaje; al igual que en el estudio de Barfod y colaboradores no se identificaron microorganismos del filum Tenericutes, las variaciones en los fila identificados se pueden atribuir a la diferencia de géneros

de ratones estudiados, ya que la diversidad de la microbiota se ve influenciada por diversos factores como el individuo, el hábitat y la alimentación (MacManes, 2011). Algunos de los género identificados por Barfod y colaboradores en las muestras de lavado vaginal fueron: *Bacteroides* sp, *Barnesiella* sp, *Odoribacter* sp, *Alistipes* sp, *Mucispirillum* sp, *Lactobacillus* sp, *Streptococcus* sp, *Peptoniphilus* sp, *Roseburia* sp, *Anaerotruncus* sp, *Oscillibacter* sp, *Pseudomonas* sp. En el estudio de Larsen y colaboradores en 1977 en donde se analizó el número de bacterias relacionadas con el epitelio vaginal de ratas ovariectomizadas, se observó que la cuenta de estos microorganismos era menor en muestras de ratas que sufrieron este tratamiento en comparación con las muestras de ratas control; por otra parte se observó que la cuenta viable de microorganismos en ratas ovariectomizadas aumentaba cuando a estas se les aplicaba un tratamiento con 17  $\beta$  estradiol. Entre los microorganismos identificados mediante el uso de técnicas de cultivo tradicionales se mencionan: Estreptococos  $\alpha$ -Hemolíticos; *Pasteurella pneumotropica*, Estreptococos no hemolíticos, *Lactobacillus* sp, Difteroidetes, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, Estreptococos del grupo D, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides corrodens*, *Fusobacterium* sp, *Eubacterium* sp, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium* sp, *Veillonella alcalescens*. Algunos de estos géneros también se identificaron en los cuatro grupos de ratones analizados (*Bacteroides* sp, *Odoribacter* sp, *Mucispirillum* sp, *Lactobacillus* sp, *Streptococcus* sp, *Roseburia* sp, *Pseudomonas* sp etc.)

Las muestras seleccionadas correspondientes a un mes, tres meses y seis meses de tratamiento de cada grupo de ratón muestran la diversidad de la microbiota durante la etapa de estro de los ratones. Se reconoce que la diversidad microbiana del tracto reproductivo es susceptible a variaciones originadas por efectos hormonales del hospedero y que presenta variaciones por la etapa del ciclo estral (Lee, *et al.*, 2013). Cuando se analizan los grupos de ratones correspondientes a un mes, 3 meses y 6 meses de tratamiento, los ratones se encontraban en estro, condición semejante a la que se encuentran los ratones que reciben un tratamiento constante con 17 $\beta$ - estradiol, esto nos permite comparar las variaciones en la microbiota de estos grupos de ratones.

Un estudio sobre la variación de la microbiota vaginal de animales de laboratorio realizado por Noguchi y colaboradores en 2003 demostró que en muestras de ratones, las UFC de microorganismos aerobios fueron mayores que el número de microorganismos anaerobios durante el estro, etapa en la que, de igual forma, se registró la mayor cuenta viable de microorganismos en las muestras. En las muestras de ratón se identificó el género *Streptococcus* sp. en el 100% de los aislados que se obtuvieron en la etapa de estro, aproximadamente  $10^5$  UFC, por el contrario, durante las etapas de diestro y anestro se identificaron bacilos anaerobios Gram positivos.

Cuando observamos los géneros identificados a los siete meses de edad de los cuatro grupos de ratones, podemos observar que en los ratones FVB existe mayor abundancia de *Porphyromonas* sp, un microorganismo anaerobio estricto mientras que en los grupos que reciben tratamiento constante con estradiol (lo que simula una etapa de estro constante), hay un aumento de microorganismos aerobios como aquellos de la familia Sphingomonadaceae.

De acuerdo a los grupos de microorganismos que presentaron diferencias particularmente en el filum Firmicutes, el grupo E7(+E2), representado como una diferencia estadísticamente significativa de este filum con respecto al grupo FVB+E2  $p= 0.025$ , muestra que el aumento en este filum no está relacionado solo con la presencia de estradiol sino que es la combinación estradiol-E7 la que genera este aumento de Firmicutes; resultados semejantes se observan en estudios sobre caracterización de microorganismos en muestras de tejido canceroso, por ejemplo en el estudio de Gao y colaboradores del 2015 se registra un aumento de Firmicutes en muestras de pacientes diagnosticados recientemente con cáncer colorectal cuando se comparan muestras de tejido (mucosa colorectal) canceroso con muestras de tejido sano adyacente; los autores señalan que este aumento también se puede relacionar con el estado de inflamación que se presenta en estos padecimientos. El aumento de abundancia de Firmicutes observado en el grupo de ratones E7(+E2) puede estar relacionado con el proceso de carcinogénesis en estos ratones.

Por otra parte se reconoce que en casos de obesidad existe un cambio en la proporción de Firmicutes/Bacteroidetes del tracto gastrointestinal, donde se observa un aumento de Firmicutes en casos de obesidad (Kotzampassi *et al.*, 2014).

Además en el estudio que realizaron Ley y colaboradores en el 2005 analizando muestras de contenido de ciego de ratones obesos de la cepa C57BL/6J, se observó un aumento en el porcentaje de Firmicutes con la consecuente disminución en el porcentaje de Bacteroidetes.

El filum Firmicutes está compuesto, de forma general, por gran variedad de microorganismos Gram positivos, incluidos cocos y bacilos con un bajo porcentaje de G-C, entre estos se encuentran Lactobacilos, Bacilos, Clostridios etc. Uno de los microorganismos que pertenece a este filum es *Gemella* sp (Baron, 1996), cuando se analizaron los datos de lavado vaginal se observó un aumento del porcentaje de este género en los ratones E7(+E2), cuando se comparó con los grupos FVB(-E2) y E7(-E2). *Gemella* sp. es un género de bacterias anaerobias facultativas, poseen metabolismo fermentativo, productoras de ácido acético y ácido láctico o CO<sub>2</sub> (Baron, 1996).

En la actualidad existen diversos estudios que han relacionado la presencia de microorganismos del género *Gemella* sp con diversos padecimientos como el carcinoma oral. Por ejemplo, en el estudio realizado por Pushalkar y colaboradores en el 2012, en donde analizaron muestras de carcinoma de células escamosas orales junto con muestras de tejido sano adyacente, pudieron identificar un aumento en el porcentaje de Firmicutes en las muestras de tejido canceroso, así como un cambio en los microorganismos asociados al filum Firmicutes en las muestras de cáncer. Los autores identificaron *Gemella haemolysans*, *G. morbillorum*, *G. sanguinis* además de otros géneros, destacando la participación de estos microorganismos como oportunistas que pueden causar infecciones locales y sistémicas, implicando inflamación, sugiriendo que puede relacionarse con la carcinogénesis ya que se reconoce que la inflamación es una de las características de las células cancerosas (Hanahan y Weinberg, 2011).

Por otra parte, dentro del filum Proteobacteria, caracterizado por incluir bacterias Gram negativas, en donde destacan las alfa, beta y gama proteobacterias, representadas en estas últimas a las enterobacterias, se encuentra el género *Proteus* sp (Baron, 1996); se observó un aumento en el porcentaje de este género en los ratones que desarrollan cáncer E7(+E2), cuando se comparó con los grupos FVB(+E2) y FVB(-E2), mostrando que este aumento puede relacionarse con la presencia de E7. Este género se reconoce como patógeno en vías urinarias y actualmente se describe como uno de los microorganismos relacionados con casos de inflamación de la próstata, sugiriendo que la inflamación crónica puede llevar al desarrollo de cáncer (Sfanos y De Marzo, 2012).

Además se ha relacionado a este microorganismo con casos de artritis reumatoide, en el estudio realizado por Ebringer y Rashid en el 2013 lograron identificar anticuerpos anti-proteus en personas con el padecimiento, esto se explica por la producción de anticuerpos contra la ureasa de *Proteus* sp que reaccionan de forma cruzada con la colágena XI presente en cartílago, esto muestra como los microorganismos influyen en la capacidad de respuesta del hospedero y como pueden involucrarse en distintos padecimientos y no sólo actuar a nivel local sino también de forma sistémica.

### **Microbiota de copro.**

De acuerdo a la revisión de Chase y colaboradores en el 2015 son pocos los trabajos que, además de identificar la microbiota del tracto reproductivo en diversos tipos de cáncer ginecológicos, analizan la diversidad microbiana del tracto gastrointestinal, esta relación puede permitir obtener un panorama amplio sobre el estado del individuo durante el padecimiento, por este motivo se incluyó el análisis de copro de los grupos de ratones analizados.

Con respecto a las muestras de copro, retomando el estudio de Barfod y colaboradores del 2013, particularmente el análisis de muestras de ciego de ratones de la cepa BALB/cJ, se identificaron los filo Firmicutes y Bacteroidetes con unos porcentajes de abundancia del 59% y 29% respectivamente. Los autores mencionan que en las comunidades de la vagina y de ciego *Ruminococcus* es el

género en común, mientras que los géneros que solo se identificaron en muestras de ciego fueron: *Robinsoniella* sp, *Parasutterella* sp y *Ramlibacter* sp. En este estudio, por el contrario se identificó al filum Bacteroidetes como el más abundante en las muestras de copro de los cuatro grupos de ratones, representando más del 50% en abundancia relativa de cada muestra, seguido por el filum Firmicutes, de igual forma se identificaron los fila Cyanobacteria, Deferribacteres, TM7 y Tenericutes en porcentajes menores, estos fila también se lograron identificar en el estudio de Gu y colaboradores en el 2013 sobre microbiota de roedores de la cepa C57BL/6, modelo de estudio ampliamente utilizado en estudios de microbiota intestinal y enfermedades.

Sin embargo, de acuerdo al estudio de Pantoja-Feliciano y colaboradores en el 2013 en el cual se llevó a cabo la caracterización de la microbiota intestinal de ratones hembra FVB, desde etapas tempranas de desarrollo hasta el destete, mediante un análisis del contenido intestinal por pirosecuenciación de la región polimórfica V2 del gen de rRNA 16S, se obtuvieron los siguientes resultados: Las madres (ratón adulto) poseían una diversidad microbiana dominada por Firmicutes (52.3%) y Bacteroidetes (42.1%), esto difiere de lo que se obtuvo en este trabajo, ya que en las muestras de copro se identificaron Bacteroidetes en mayor porcentaje.

Estos datos muestran que las comunidades bacterianas identificadas en los cuatro grupos presentan diferencias con los grupos identificados en distintas cepas de ratón que se han analizado en otros trabajos. En las muestras de copro se identifican Bacteroidetes en mayor proporción, esta variación puede deberse a las condiciones de mantenimiento y alimentación de los animales o al tipo de muestra analizada, pues se ha reportado que la microbiota varía en las distintas áreas de tracto gastrointestinal (Pang *et al.*, 2012 Gu *et al.*, 2013).

Cuando se analizó la diferencia de medias a nivel de fila, solo se registró una disminución de Tenericutes en el grupo E7+E2 cuando se comparó con el grupo FVB+E2  $p=0.0383$ , sin embargo no se observó diferencias en los fila dominantes Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria.

La abundancia Bacteroidetes se caracteriza por la predominancia de microorganismos de la familia S24-7, estos microorganismos se han identificado en estudios en los que se utilizan ratones como modelo de estudio, por ejemplo en el estudio de Sands y colaboradores en el 2014, en donde analizaron la microbiota de muestras de heces de ratones C57BL/6J tratados con omeprazol, observando que existe una predominancia de bacteroidetes de la familia S24-7, resultados que concuerdan con los obtenidos en este trabajo. Con estos resultados se muestra que no existen cambios en la microbiota de copro de ratones transgénicos K14E7 durante el desarrollo de CaCu.

### **Validación de hipótesis.**

A pesar de que en las muestras de lavado vaginal se observaron cambios en los porcentajes de abundancia relativa de microorganismos en el grupo de ratones que desarrolla cáncer, cuando se compara con los otros grupos estudiados, algunos cambios no fueron estadísticamente significativos, por lo tanto no se observó una disbiosis progresiva durante el desarrollo de CaCu. Sin embargo, algunos resultados nos permitieron observar que las variaciones en la diversidad microbiana pueden ser el resultado de una combinación de la presencia de 17  $\beta$ -estradiol con la presencia de E7.

Por otra parte, este trabajo permitió conocer la diversidad microbiana del tracto reproductivo del modelo de estudio, particularmente de los ratones que desarrollan cáncer, contribuyendo a una mejor comprensión del modelo de estudio.

Dentro de las perspectivas de este trabajo, se incluye el llevar a cabo el análisis consecutivo de los ratones para discutir si esta condición permite obtener resultados diferentes, particularmente en el caso de las muestras de copro.

Con respecto al tracto reproductivo, la bibliografía señala que además de la producción de metabolitos bacterianos que pueden contribuir en la carcinogénesis es la regulación de la respuesta inmune, particularmente la inflamación, uno de los principales procesos en el que las bacterias pueden desempeñar un papel importante como cofactor para el desarrollo de cáncer (Alistair y Warren, 2002;



Doerflinger, *et al.*, 2014). Sería interesante analizar si existe un proceso inflamatorio en los ratones K14E7 tratados con estradiol y si hay diferencias con respecto a los otros grupos de ratones. Interesantemente, en el estudio de Doerflinger y colaboradores en el 2014 observaron que las bacterias del tracto reproductivo femenino alteran la respuesta inmune del tejido epitelial de manera específica, observando que cuando se inoculan bacterias representativas de VB en células epiteliales de vagina humana se incrementa la expresión de mucinas y se monta una respuesta inmune proinflamatoria con expresión de interleucina1 $\beta$ , interleucina 6, interleucina 8, factor de necrosis tumoral alfa que afectan la función de barrera de las células. Este efecto no se observó cuando se inocularon bacterias dominantes del tracto vaginal *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus crispatus*.

Con este antecedente surge la idea de probar el efecto que tienen las bacterias cultivables que se identificaron en el modelo que desarrolla cáncer, cuando se inoculan en el ratón que expresa el transgén de E7 pero que no recibe el tratamiento con estradiol, para conocer si ese microorganismo es capaz de influir en el estado del tejido epitelial y causar daños que puedan progresar a cáncer.

## X.CONCLUSIONES

En las muestras de lavado vaginal existe un aumento en el porcentaje de abundancia relativa de microorganismos del filum Firmicutes en los ratones del grupo E7(+E2) cuando se compara con el porcentaje del grupo FVB(+E2).

El género de Firmicutes que aumenta es *Gemella* sp. Este aumento de abundancia en el grupo E7+E2 se observa cuando se compara con los porcentajes de los grupos FVB(-E2) y E7(-E2).

Existe un aumento en el porcentaje de abundancia relativa *Proteus* sp. en los ratones que desarrollan cáncer E7(+E2), cuando se comparó con los grupos FVB(+E2) y FVB(-E2).

A pesar de que los ratones E7 que reciben tratamiento hormonal desarrollaron CaCu, no se observaron diferencias en la composición bacteriana de las muestras de copro cuando se compararon los porcentajes de microorganismos de los cuatro grupos.

En las muestras de copro existe una mayor abundancia de microorganismos del filum Bacteroidetes, con predominancia de microorganismos de la familia S24-7.

No se observó una disbiosis progresiva de la microbiota del tracto reproductivo de ratones transgénicos que desarrollan CaCu y no se observaron cambios en la microbiota intestinal durante el desarrollo de CaCu, sin embargo, se encontraron cambios en la abundancia de bacterias particulares como *Gemella* sp. y *Proteus*

## IX. REFERENCIAS

- Barfod, K.K.; Roggenbuck, M.; Hansen, L.H.; Schjørring, S.; Larsen, S.T.; Sørensen, S.J.; Kroghfelt, K.A.(2013). The murine lung microbiome in relation to the intestinal and vaginal bacterial communities. *BMC Microbiology*. 13:303.
- Baron S. (ed) 1996. Medical Microbiology. 4th edition.University of Texas Medical Branch Galveston (TX).
- Behbakht, K.; Friedman, J.; Heimler, I.; Aroutcheva, A.; Simoes, J.; Faro S. (2002). Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: a case–control study. *Infect Dis Obstet Gynecol*.10:181–186.
- Boyle, D.C.M.; Barton, S.E.; Uthayakumar, S.; Hay, P.E.; Pollock J.W.; Steer, P.J.; Smith J.R.(2003). Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia? *Int J Gynecol Cancer*. 13:159-163.
- Brake, T.; Connor, J.P.; Petereit, D.G.; Lambert, P.F. (2003). Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: Identification of *minichromosome maintenance protein 7* as an informative biomarker for human cervical cancer. *Cancer Res*. 63:8173-8180.
- Brake, T. and Lambert, P.F. (2005). Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(7): 2490–2495.
- Brosius, J.; Palmer, M.L.; Poindexter, J.K.; Noller, H.F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S Ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(10):4801-4805.
- Bulut, G.; Fallen, S.; Beauchamp, E.M.; Drebing, L.E.; Sun, J.; Berry, D.L.; Kallakury, B.; Crum, C.P.; Toretzky, J.A.; Schlegel, R.; Üren, A. (2011). Beta-catenin accelerates human papilloma virus type-16 mediated cervical carcinogenesis in transgenic mice. *PLoS ONE* 6(11).
- Castellsagué, X.; Bosch F.X.; Muñoz, N. (2002). Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research*. 89:191-199.
- Chakravorty, S.; Helb, D.; Burday, M; Connell, N.; Alland, D.(2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 69(2): 330–339.
- Chase, D.; Goulder, A.; Zenhausem, F.; Monk, B.; Herbst-Kralovetz, M. (2015). The vaginal and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: A review of applications in etiology, symptoms and treatment. *Gynecologic Oncology*. 138:190–200.
- Chen, D.; Gyllensten, U. (2014). Systematic investigation of contribution of genetic variation in the HLA-DP region to cervical cancer susceptibility. *Carcinogenesis*.
- Clemente, Jose C.; Ursell, Luke K.; Parfrey, Laura W.; Knight, Rob. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 148.1258-1270.
- Cogliano, V. J.; Baan, R; Straif, K.; Grosse, Y.; Lauby-Secretan, B.; Ghissassi, F. E.; Bouvard, V.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Freeman C.; Galichet, L.; Wild C.P. (2011) Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst*. 103:1827–1839.
- Collins, S.; Rollason, T.P.; Young, L.S.; Woodman, C.B.J. (2010). Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study. *European Journal of Cancer*. 46:405-411.
- Davis-Devine, S.; Day, S.J.; Freund, G.G. (2005). Test performance comparison of inform HPV and hybrid capture 2 high-risk HPV DNA tests using the SurePath Liquid-Based Pap Test as the collection method. *Am J Clin Pathol*. 124:24-30.
- Diaz-Chavez, J.; Hernandez-Pando, R.; Lambert, P.F.; Gariglio, P. (2008).Down-regulation of transforming growth factor- $\beta$  type II receptor (TGF- $\beta$ RII) protein and mRNA expression in cervical cancer. *Molecular Cancer*. 7(3).
- Discacciati, M.G.; Simoes, J.A.; Lopes, E.S.; Silva, S.M.; Montemor, E.B.L.; Rabelo-Santos, S.H.; Westin, M.C.A. (2006). Is bacterial vaginosis associated with squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix? *Diagnostic Cytopathology*. 34(5): 323-325.

- 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*.
- Drell, T.; Lillsaar, T.; Tummeleht, L.; Simm, J.; Aaspollu, A.; Vain, E.; Saarma, I.; Salumets, A.; Donders G.G.G.; Metsis, M. (2013). Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *PLoS ONE* 8(1).
- Ebringer, A.; Rashid, T. (2014). Rheumatoid arthritis is caused by a *Proteus* urinary tract infection. *APMIS*. 122:363–368.
- Fang, J.; Zhang, H.; Jin, S. (2014). Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumor Biol*.
- Fox, J.G. and Wang, T.C. (2007). Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J. Clin. Invest*. 117:60–69.
- Gajer, P.; Brotman, R.M.; Bai, G.; Sakamoto, J.; Schütte U.M.E.; Zhong, X.; Koenig S.S.K.; Fu, L.; Ma, Z.; Zhou, X. Abdo, Z.; Forney L. J.; Ravel, J. (2012) Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med*. 4(132).
- Gao, W.; Weng, J.; Gao, Y.; Chen, X. (2013). Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*.13:271.
- Gao, Z.; Guo, B.; Gao, R.; Zhu, Q.; Qin, H. (2015). Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*.(6).
- Gillet, E.; Meys, J.F.A.; Verstraelen, H.; Bosire, C.; Sutter, P.D.; Temmerman, M; Broeck, D.V. (2011) Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*. 11(10):
- Gillet, E.; Meys, J.F.A.; Verstraelen, H.; Verhelst, R.; Temmerman, M.; De Sutter, P.; Broeck D.V. (2012). Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 7(10).
- Gravitt, P.E. (2011). The known unknowns of HPV natural history *J Clin Invest*. 121(12):4593–4599
- Grivennikov, S.I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*. 35(2): 229–244.
- Gruber, C.J.; Tschugguel, W.; Schneeberger, C.; Huber, J.C. (2002). Production and action of estrogens. *N Engl J Med*. 346(5): 340-352.
- Gu, S.; Chen, D.; Zhang, J-N.; Lv, X.; Wang, K.; Duan, L-P.; Nie, Y.; Wu, X-L. (2013). Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS ONE* 8(10).
- Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144.
- Hausen, H.Z. (1996). Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1288 F55-F78.
- Hausen H.Z. (2002) Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature*. 2: 342-350.
- Heck, D.V.; Yee, C.L.; Howley, P.M.; Munger, K. (1992). Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 4442-4446.
- Hellberg, D. (2012). Sex steroids and cervical cancer. *Anticancer Research*. 32: 3045-3054.
- Herber, R.; Liem, A.; Pitot, H.; Lambert, P.F. (1996). Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 Oncogene. *Journal of virology*. 70(3): 1873–1881.
- Hildesheim, A. and Wang, S. S. (2002). Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Research*. 89:229-240.
- Instituto Nacional de Geografía y Estadística. Principales causas de muerte. Variables: año de registro 2013. Sexo: Mujer. Grupo de edad: Total. Estados Unidos Mexicanos. [En línea 15-abr-15].  
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo125&s=est&c=23589>
- Kazi, Y.F.; Saleem, S.; Kazi, N. (2012). Investigation of vaginal microbiota in sexually active women using hormonal contraceptives in Pakistan. *BMC Urology*. 12:22.
- Kim, T.K.; Thomas, S.M.; Ho, M.; Sharma, S.; Reich, C.I.; Frank, J.A.; Yeater, K.M.; Biggs, D.R.; Nakamura, N.; Stumpf, R.; Leigh, S.R.; Tapping, R.I.; Blanke, S.R.; Slauch, J.M.; Gaskins,

- H.R.; Weisbaum, J.S.; Olsen, G.J.; Hoyer L.L.; Wilson, B.A. (2009). Heterogeneity of vaginal microbial communities within Individuals. *J Clin Microbiol.* 47(4) 1181–1189.
- Kotzampassi, K.; Giamarellos-Bourboulis, E. J.; Stavrou, G. (2014). Obesity as a consequence of gut bacteria and diet interactions. *ISRN Obesity*.
- Krauss-Silva, L.; Almada-Horta, A.; Alves, M.B.; Camacho, K.G.; Moreira, M.E.L.; Braga, A. (2014). Basic vaginal pH, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis: prevalence in early pregnancy and risk of spontaneous preterm delivery, a prospective study in a low socioeconomic and multiethnic South American population. *BMC Pregnancy and Childbirth.*14:107.
- Larsen, B.; Markovetz, A. J.; Galask, R. P. (1977) Role of estrogen in controlling the genital microflora of female rats. *Appl. Env. Microbiol.*34: 534-540.
- Lax, A. J.; Warren, T. (2012). How bacteria could cause cancer: one step at a time. *TRENDS in Microbiology.* (10) 293-299.
- Lee, J.E.; Lee, S.; Lee, H.; Song, Y-M.; Lee, K.; Han, M. J.; Sung, J.; Ko, G. (2013) Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. *PLoS ONE* 8(5).
- Ley, R. E.; Bäckhed, F.; Turnbaugh, P.; Lozupone, C. A.; Knight, R. D.; Gordon, J. I.( 2005). Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS.* 102(31):11070–11075.
- Liehr, J.G. (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine Reviews* 21(1): 40–54.
- Longatto-Filho, A.; Hammes, L.S.; Sarian, L.O.; Roteli-Martins, C.; Derchain, S.F.M.; Erzen, M.; Branca, M.; Tatti, S.; Naud, P.; De Matos, J.C.; Gontijo, R.; Maeda M.Y.S.; Lima, T.; Costa, S.; Syrjänen, S.; Syrjänen, K. (2010). Hormonal contraceptives and the length of their use are not independent risk factors for high-risk HPV infections or high-grade CIN. *Gynecol Obstet Invest.* 71:93–103.
- Ma, B.; Forney, L.J.; Ravel, J. (2012). The vaginal microbiome: rethinking health and diseases. *Annu Rev Microbiol.* 66: 371–389.
- MacManes, M. D.(2011). Promiscuity in mice is associated with increased vaginal bacterial diversity. *Naturwissenschaften.* 98(11): 951–960.
- Mager, D.L. (2006). Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review. *Journal of Translational Medicine.* 4:14.
- Magnusson P.K.E. and Gyllensten U.B. (2000). Cervical cancer risk: is there a genetic component? *Molecular medicine today.* 6:145-148.
- Marzo-Castillejo M.; Bellas-Beceiro B.; Vela-Vallespín C.; Nuin-Villanueva M.; Bartolomé-Moreno C.; Vilarrubi-Estrella M.; Melús Palazón E. (2012). Recomendaciones de prevención del cáncer. *Aten Primaria.* 44 Supl 1:23-35.
- McCredie, M.R.E.; Sharples, K.J.; Paul, C.; Baranyai, J.; Medley, G.; Jones, R.W.; Skegg D.C.G. (2008). Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 9: 425–34.
- Mikamo, H.; Sato, Y.; Hayasaki, Y.; Kawazoe, K.; Izumi, K.; Ito, K.; Yamada, Y.; Tamaya, T. (1999) Intravaginal bacterial flora in patients with uterine cervical cancer. High incidence of detection of *Gardnerella vaginalis*. *J Infect Chemother.* 5:82-85.
- Moore, P.S.; Chang, Y. (2010). Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer.* 10(12): 878–889.
- Münger, K.; Basile, J. R.; Duensing, S.; Eichten, A.; Gonzalez, S.; Grace, M.; Zacny, V.L. (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20:7888–7898.
- Muñoz, N.; Bosch, F. X.; Sanjose, S.; Herrero, R.; Castellsague, X.; Shah, K. V.; Snijders, P. J.F.; Meijer, C.J.L.M. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The new england journal of medicine.* 348(6): 518-527.
- Muñoz, N; Méndez, F.; Posso, H. Molano, M.; van den Brule, A. J. C.; Ronderos, M.; Meijer, C.; Muñoz, I. (2004). Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *Journal of Infectious Diseases.* 190:2077–87.
- Noguchi, K.; Tsukumi, K.; Urano, T. (2003). Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. *Comparative Medicine.* 53:404-412.

- Nunobiki, O.; Ueda, M.; Toji, E.; Yamamoto, M.; Akashi, K.; Sato, N.; Izuma, S.; Torii, K.; Tanaka, I.; Okamoto, Y.; Noda, S. (2011). Genetic polymorphism of cancer susceptibility genes and HPV infection in cervical carcinogenesis. *Pathology Research International*.
- OMS- World Health Organization. Media Centre. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Fact sheet N°380. 2013. [En línea 15-abr-14] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>
- Pang, W.; Vogensen, F.K.; Nielsen, D.S.; Hansen, A.K. (2012). Faecal and caecal microbiota profiles of mice do not cluster in the same way. *Laboratory Animals*. 46:231–236.
- Pantoja-Feliciano, I. G.; Clemente, J. C.; Costello, E. K.; Perez, M. E.; Blaser, M.J.; Knight, R.; Dominguez-Bello, M. G. (2013). Biphasic assembly of the murine intestinal microbiota during early development. *International Society for Microbial Ecology*.(7)1112–1115.
- Pavic N. (1984). Is there a local production of nitrosamines by the vaginal microflora in anaerobic vaginosis/ Trichomoniasis? *Medical Hypotheses*. 15:433-436.
- Prokopczyk, B.; Cox, J.E.; Hoffmann, D.; Waggoner, E. (1997). Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst*. 89(12):868-873.
- Pushalkar, S.; Ji, X.; Li, Y.; Estilo, C.; Yegnanarayana, R.; Singh, B.; Li, X.; Saxena, D. (2012). Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiology*.12:144.
- Pyles, R.B.; Vincent, K.L.; Baum, M.M.; Elsom, B.; Miller, A.L.; Maxwell, C.; Eaves-Pyles, T.D.; Li, G.; Popov, V.L.; Nusbaum, R.J.; Ferguson, M.R. (2014) Cultivated vaginal microbiomes alter HIV-1 infection and antiretroviral efficacy in colonized epithelial multilayer cultures. *PLoS ONE* 9(3).
- Ravel, J.; Gajer, P.; Abdob, Z.; Schneider, M.G.; Koenig S.S.K.; McCulle, S.L.; Karlebach, S.; Gorle, R.; Russell, J.; Tacket, C.O.; Brotman, R.M.; Davis, C.C.; Ault, K.; Peralta, L.; Forney L.J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.108:4680–4687.
- Sánchez-Hernández, J. A.; Mayta-Baldivieso, M.J.; Rivera-Tapia, J.A. Alteraciones del pH vaginal asociado a lactobacilos o bacilo de Döderlein. *Rev Latinoamer Patol Clin*. 59(1): 56-60.
- Sands, S. A.; Tsau, S.; Yankee, T. M.; Parker, B. L.; Ericsson, A. C.; LeVine, S. M.(2014). The effect of omeprazole on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6J and SJL/J mice. *BMC Research Notes*. 7:605.
- Sankaranarayanan, R.; Wesley, R. S. (2005). Manual práctico para la detección visual de las neoplasias cervicales. Centro internacional de Investigaciones sobre el cáncer. Organización Mundial de la Salud. Publicación Técnica del CIIC No. 41.
- Schmidt, Brian L.; Kuczynski, J.; Bhattacharya, A.; Huey, B.; Corby, P. M.; Queiroz, E. L. S.; Nightingale, K.; Kerr, A. R.; DeLacure, M. D.; Veeramachaneni, R.; Olshen, A. B.; Albertson, D. G. (2014). Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLoS ONE* 9(6).
- Schwabe, R.F. and Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13:800-812.
- Sfanos, K. S.; De Marzo, A. M.; (2012). Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*. 60(1): 199–215.
- Slebos, R.J.C.; Lee, M.H.; Plunket, B.S.; Kesisis, T.D.; Williams, B.O.; Jacks, T.; Hedrick, L.; Kastan, M.B.; Cho, K.T. (1994). p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 5320-5324.
- Sobhani, I.; Tap, J.; Roudot-Thoraval, F.; Roperch, J.P.; Letulle, S.; Langella, P.; Corthier, G.; Van Nhieu, J.T.; Furet, J.P. (2011) Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS ONE* 6(1).
- Solomon, D.; Davey, D.; Kurman, R.; Moriaty, A.; O'Connor, D.; Prey, M.; Rab, S.; Sherman, M.; Wilbur, D.; Wright, T.Jr; Young, N. (2002).The 2001 Bethesda system. Terminology for reporting results of cervical cytology. *Journal of the American Medical Association*. 287(16): 2114-2119.
- Son, J.; Wook, J.P.; Lambert, P.F.; Chung, S-H. (2013). Requirement of estrogen receptor alpha DNA-binding domain for HPV oncogene-induced cervical carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*. 35(2):489–496.

- Song, S.; Liem, A.; Miller, J.A.; Lambert, P.F. (2000). Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology* 267:141-150.
- Sunthamala, N.; Thierry, F.; Teissier, S.; Pientong, C.; Kongyingoes, B.; Tangsiriwatthana, T.; Sangkomkamhang, U.; Ekalaksananan, T. (2014) E2 Proteins of high risk human papillomaviruses down-modulate STING and IFN- $\kappa$  transcription in keratinocytes. *PLoS ONE* 9(3).
- Tansarli, G.S.; Kostaras, E.K.; Athanasiou, S.; Falagas M.E. (2013). Prevalence and treatment of aerobic vaginitis among non-pregnant women: evaluation of the evidence for an underestimated clinical entity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32:977–984.
- Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation.* 36: 131–149.
- Weiderpass, E. and Labreche, F. (2012). Malignant tumors of the female reproductive system. *Saf Health Work.* 3:166-180.
- Weinstein, L.; Howard, J.H. (1937). The incidence of the Döderlein vaginal bacillus during the post-climacterium. *Yale J Biol Med.* 10(2):185-90.
- Whitmore, S.E. and Lamont, R.J. (2014). Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog* 10(3).
- Wolrath, H.; Forsum, U.; Larsson, P.G.; Bore, H. (2001) Analysis of bacterial vaginosis-related amines in vaginal fluid by gas chromatography and mass spectrometry *J. Clin. Microbiol.* 39(11):4026-4031.
- Yoon, C-S; Kim, K-D; Park, S-N; Cheong, S-W. (2001).  $\alpha_6$  integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 283: 668–673.
- Zhou, X.; Bent, S.J.; Schneider M.G.; Davis, C.C.; Islam, M.R.; Forney L.J. (2004) Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology.* 150:2565–2573.

## **XI. ANEXOS**

### **ANEXO A. Técnica de inclusión en parafina**

1. Alcohol 50% durante 1 hora
2. Alcohol 60% durante 1 hora
3. Alcohol 70% durante 1 hora
4. Alcohol 80% durante 1 hora
5. Alcohol 90% durante 1 hora
6. Alcohol 100% durante 1 hora
7. Alcohol 100% durante 1 hora
8. 50/50 alcohol/xilol durante 1 hora
9. Xilol 100% durante 1 hora
10. Inclusión en parafina
11. Parafina 1 (60 °C) durante 1 hora
12. Parafina 2 (60 °C) durante 30 min
13. Parafina 3 (60 °C) durante 30 min

### **ANEXO B. Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina**

1. 20 min en xileno para desparafinar
2. 20 min en etanol 100°
3. 10 min en etanol 96°
4. 10 min en etanol 80°
5. 10 min en etanol 50°
6. 5 min en agua destilada
7. 5-10 min en Hematoxilina de Mayer
8. 15 min en agua corriente. Diferenciación.
9. 5 min en agua destilada
10. 2 min en Eosina al 2 %
11. 5 min en etanol 96°
12. 20 min en etanol 100° y Montado de la preparación.



**ANEXO C. Lista completa de iniciadores y “barcodes” utilizados en la preparación de genotecas de 16S rDNA de las muestras de lavado y copro.**

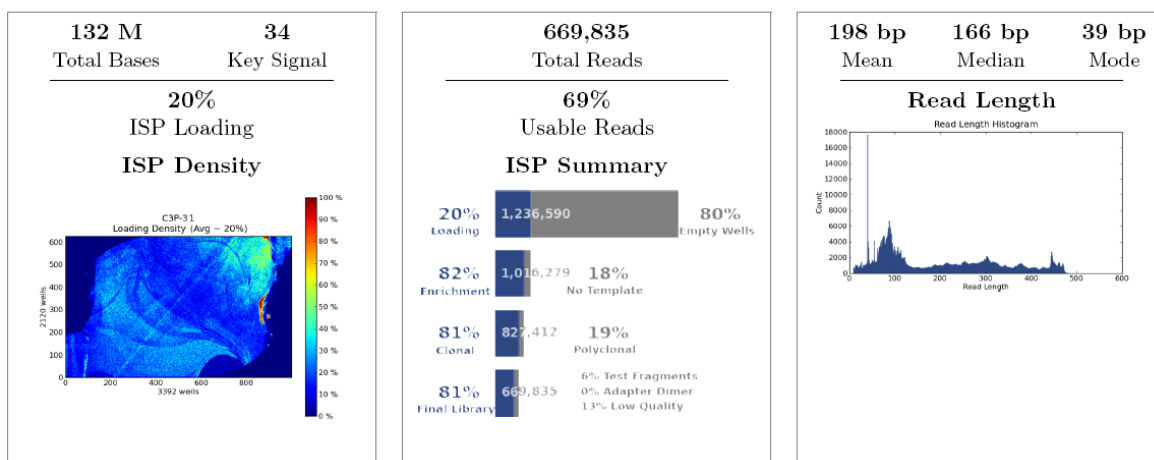
Nombre del iniciador	Ion Torrent “Linker”	Barcode (GOLAY)	Espaciador	Iniciador 16S rRNA (5' – 3')
V3-341 F1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GATCTGCGATCC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAGCTCATCAGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAACAACAGCT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCAACACCATCC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCGATATATCGC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGCAATCCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTCGTGCACAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GTATCTGCGCGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGGGAAAGTC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAAATTCGGGAT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGATTGACCAAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGTTACGAGCTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GCATATGCACTG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAACTCCCGTGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGCGTTAGCAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACGAGCCCTAA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CACTACGCTAGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGCAGTCTCGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACCATAGTCCG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGGACATCTCTT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GAACACTTTGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGGGTACACGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGGCGCTCCTT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAATACGGATCG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGGAATTAGAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGTGAATTCGGA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CATTCGTGGCGT	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACGCACGCTAG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-341 F29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACACTGTTCATG	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
V3-518 R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCGACTACCAGGGTATCTAAT	-	CC	ATTACCGCGGCTGCTGG

## ANEXO D. Análisis por secuenciación semiconductor de iones y secuenciación por capilar de genoteca de regiones V3-V4 de rDNA 16S de lavado vaginal.

Cuando se llevó a cabo la secuenciación masiva de la genoteca LVTB, el análisis en el software Ion Torrent suite v4.2.1 mostró un porcentaje de cargado del 20%, un valor menor al límite de calidad (30%), en esta secuenciación se obtuvo poca información para analizar (669.835 lecturas) (Fig.1).

Run Report for LVTB-300415

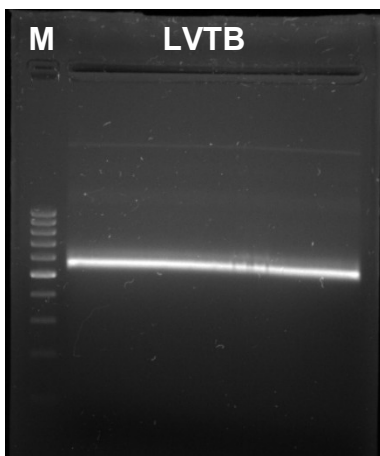
### Run Summary



**Fig. 1** Reporte de análisis de la genoteca LVTB. Porcentaje de cargado de muestra en el chip (ISP "Ion Sphere Particles", resumen del estado de las ISP y características de las lecturas obtenidas.

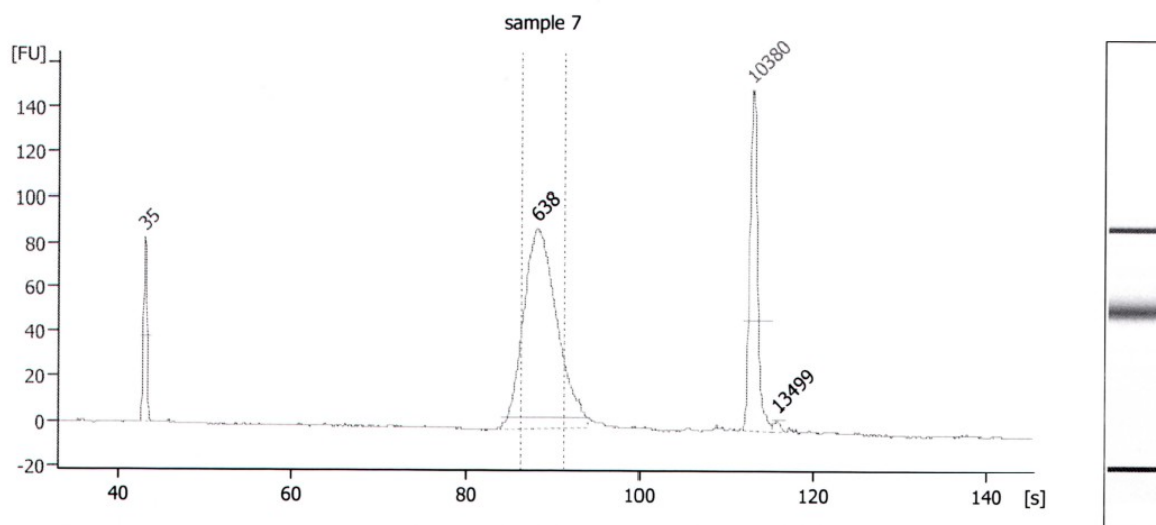
Cuando se analizaron las posibles causas de este resultado llamó la atención del tamaño del amplicón de la genoteca LVTB.

Cuando se llevó cabo la preparación de la genoteca de las regiones polimórficas V3-V4 de las muestras de lavado vaginal, obtenida por PCR y se observó el gel preparativo, se evidenció un fragmento con un tamaño entre 500 y 600 pb aproximadamente (Fig. 2).



**Fig. 2** Gel preparativo para purificación de genoteca para secuenciación LVTB. Electroforesis en gel de agarosa al 2.0% teñido con 0.7mL de colorante Midori Green Advance (1:15). Marcador de tamaño molecular 100pb y pool LV-TB (100 $\mu$ L), 100V/50min.

Sin embargo, cuando esta genoteca se procesó en el equipo Bioanalyzer, para verificar el tamaño de los amplicones, se registró un tamaño mayor al esperado y al discernido en el gel preparativo (Fig.3).



**Fig. 3** Electroferograma de muestra LV-TB, se observa un pico uniforme en el tamaño correspondiente a 638 pb.

El electroferograma muestra que se identificaron amplicones con tamaños mayores 534 pb tamaño obtenido cuando se analiza la secuencia de rDNA 16S de *Escherichia coli* K-12 (Brosius, et al., 1978).

Partiendo del supuesto de que se trabaja con muestras ambientales que no necesariamente empatan con el modelo de *E. coli* K-12 y de que entre las bacterias los tamaños de las regiones polimórficas V3 y V4 pueden variar de acuerdo a las especies, haciendo con esto que se genere la variación en el tamaño de amplicon obtenido, se procedió a clonar la genoteca LVTB utilizando el kit GeneJET™ PCR Cloning Kit de la casa comercial Fermentas, con la finalidad de responder si realmente es la variación de en estas regiones la responsable de la obtención de fragmentos de tamaño mayor a 534 pb en las genotecas obtenidas por PCR.

Con esta técnica se obtuvieron amplicones individuales que podrán ser analizados para identificar el tamaño que abarcan las regiones V3 y V4 delimitado por los iniciadores que flanquean estas regiones.

Se aislaron 10 clonas y se llevó a cabo la extracción de plásmido por lisis alcalina, el plásmido se llevó a secuenciación por capilar, utilizando los iniciadores pJET1 Forward – pJET1 Reverse, y las secuencias obtenidas se analizaron utilizando los programas BioEdit Sequence Alignment Editor® y VECTOR NTI advance™ 11.0.

Se aislaron 10 clonas y se llevó a cabo la extracción de plásmido por lisis alcalina, el plásmido se llevó a secuenciación por capilar utilizando los iniciadores pJET1 Forward – pJET1 Reverse, y las secuencias se analizaron utilizando los programas BioEdit Sequence Alignment Editor® y VECTOR NTI advance™ 11.0.

Con las secuencias obtenidas Se llevó a cabo un alineamiento en BLAST para asegurar que pertenecían a la región de interés. Se identificó el par de iniciadores CGO 465 en las secuencias F y R complementaria de cada clona, en este paso solo se pudieron identificar los iniciadores en seis muestras.

Estas secuencias se alinearon y se delimitó la secuencia consenso que abarcan los iniciadores CGO 465, finalmente la secuencia consenso se alineó con la secuencia de referencia obtenida del alineamiento en BLAST con mayor porcentaje de similitud (Fig. 4)



Fig.4 Alineamiento de secuencias F y R complementaria delimitadas de colonia identificada como CV3V4204 obtención de secuencia consenso delimitada por iniciadores CGO465.

Cuando se obtuvo la secuencia consenso se llevó a cabo un alineamiento utilizando como referencia la secuencia de E. coli K-12 (Brosius et al., 1978) y con las primeras cinco secuencias que arrojaron el mayor porcentaje de similitud al hacer el alineamiento en BLAST (Fig. 5)



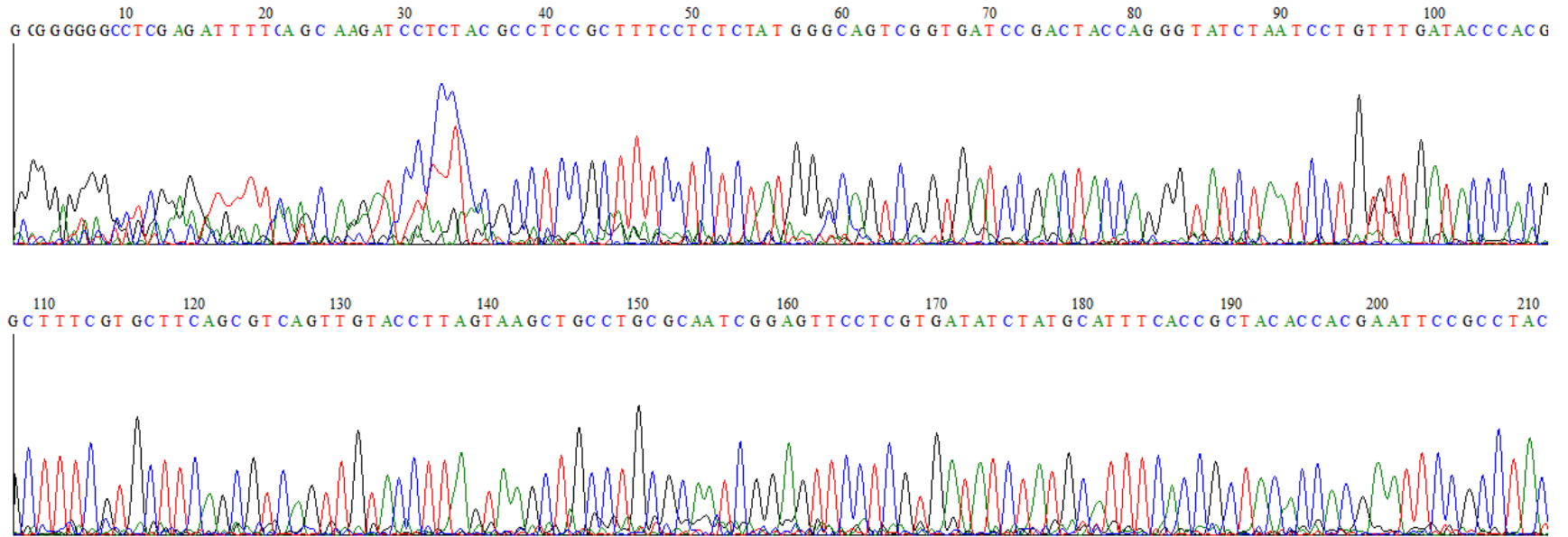
Fig.5 Alineamiento de secuencias de secuencias de secuencia consenso delimitada por iniciadores CGO465, utilizando la secuencia de rDNA16S de E. coli K-12 descrita por Brosius y colaboradores en 1978.

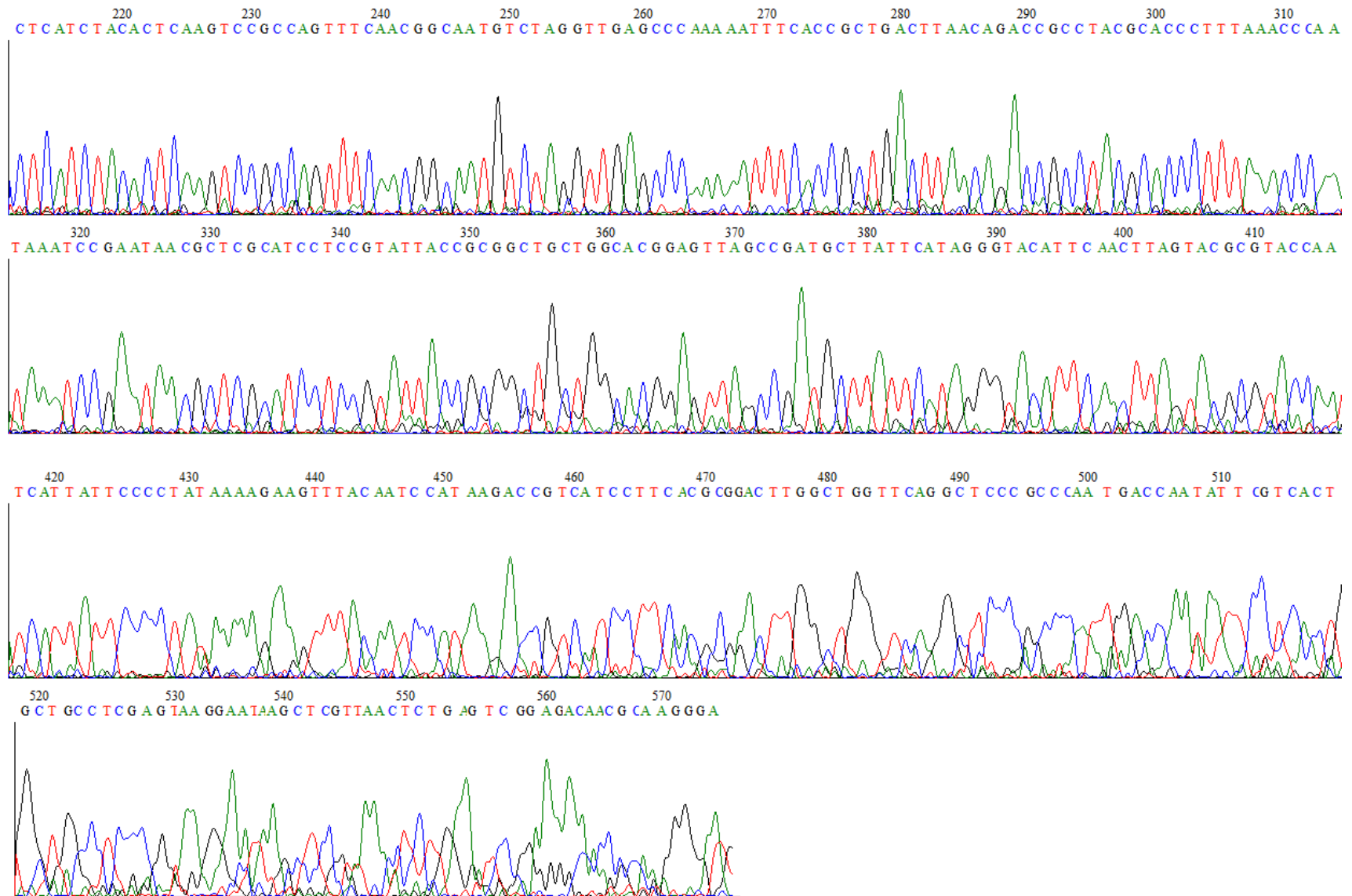
Con este alineamiento se observó que la secuencia consenso abarca desde la posición 339 a la posición 804 lo que corresponde a un tamaño de 465 pb, el tamaño esperado de acuerdo al diseño de iniciadores en el modelo de *E. coli* K-12, lo que sugiere que la variación en tamaño no corresponde a un aumento del tamaño de las regiones polimórficas V3 o V4.

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Chakravorty y colaboradores en el 2007 en donde pudieron identificar de forma total ocho de las nueve regiones polimórficas del gen de rDNA 16S en 113 secuencias analizadas en su estudio. Pudieron identificar las regiones V3 que abarca las posiciones 433 a 497 y la región V4 que abarca las posiciones 576 a 682, utilizando como referencia la nomenclatura descrita por Brosius y colaboradores en 1978.

Ya que con este análisis preliminar se determinó que el aumento en el amplicón para secuenciación no se debe a alguna variación en tamaño de la región V3 o V4 y tampoco a las secuencias que se encuentran entre estas regiones (que se encuentran incluidas en las regiones que abarcan los iniciadores CGO 465), es necesario replantear el origen de esta variación.

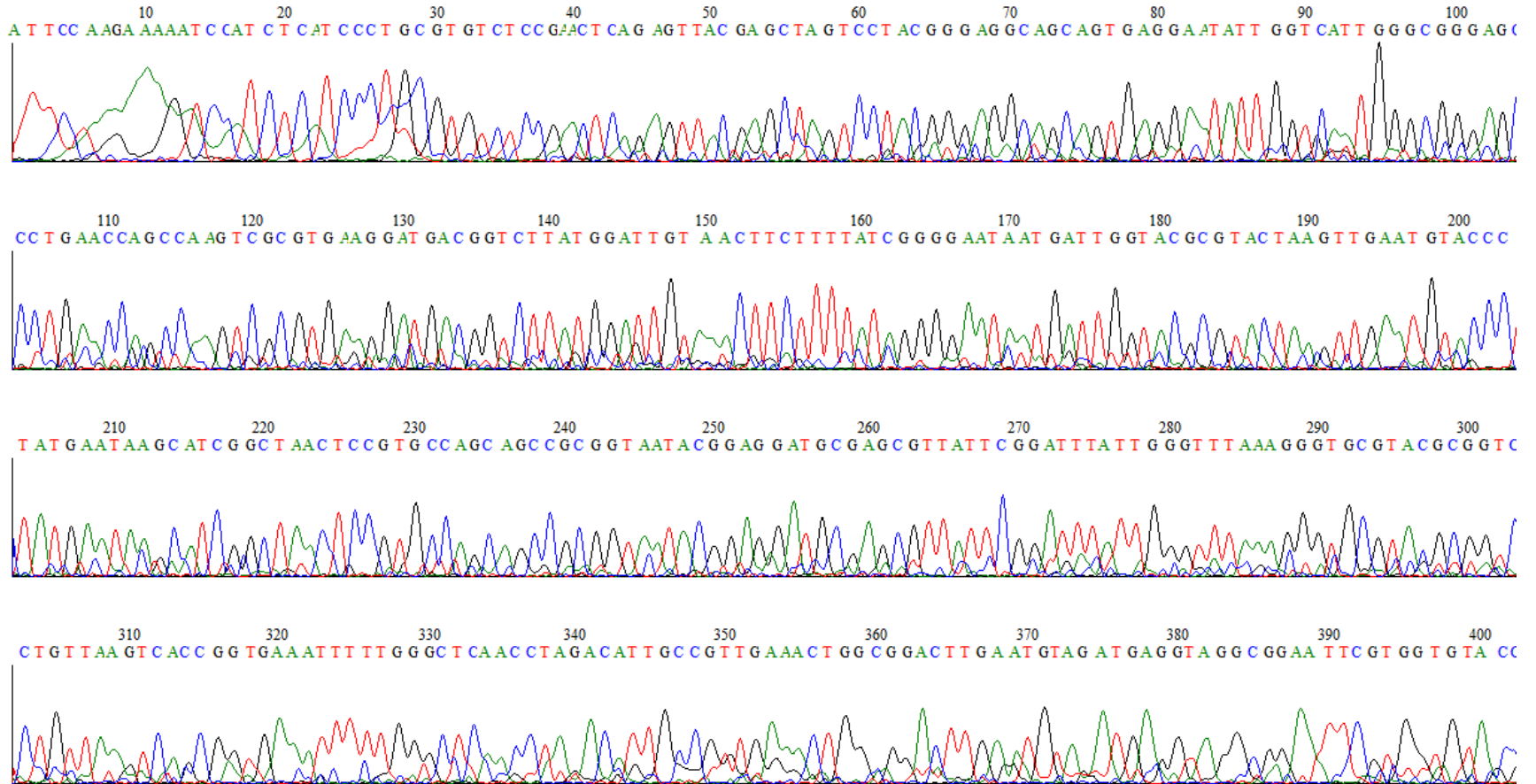
A continuación se muestran los electroferogramas de las secuencias analizadas:

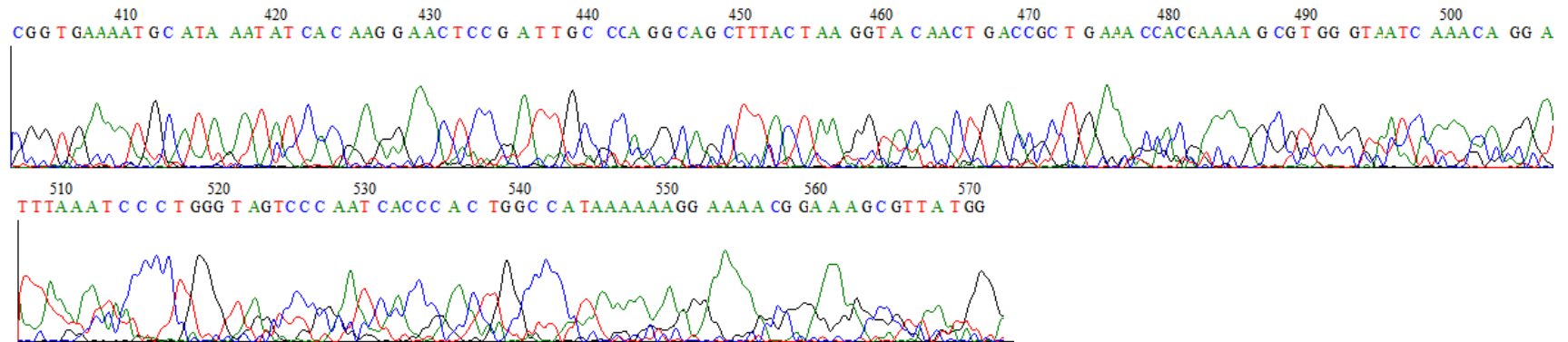
**ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4203F – SECUENCIA FORWARD**



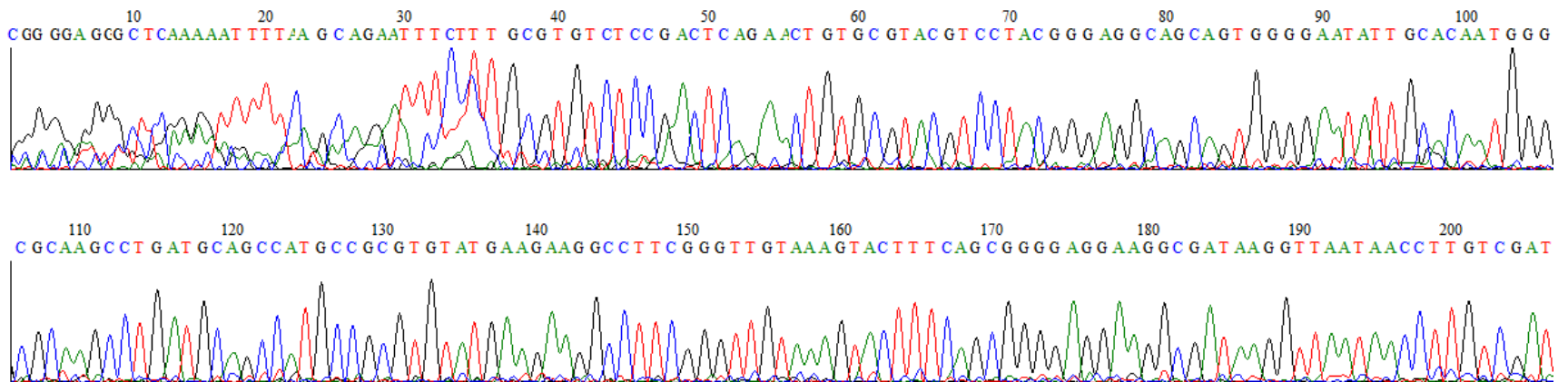


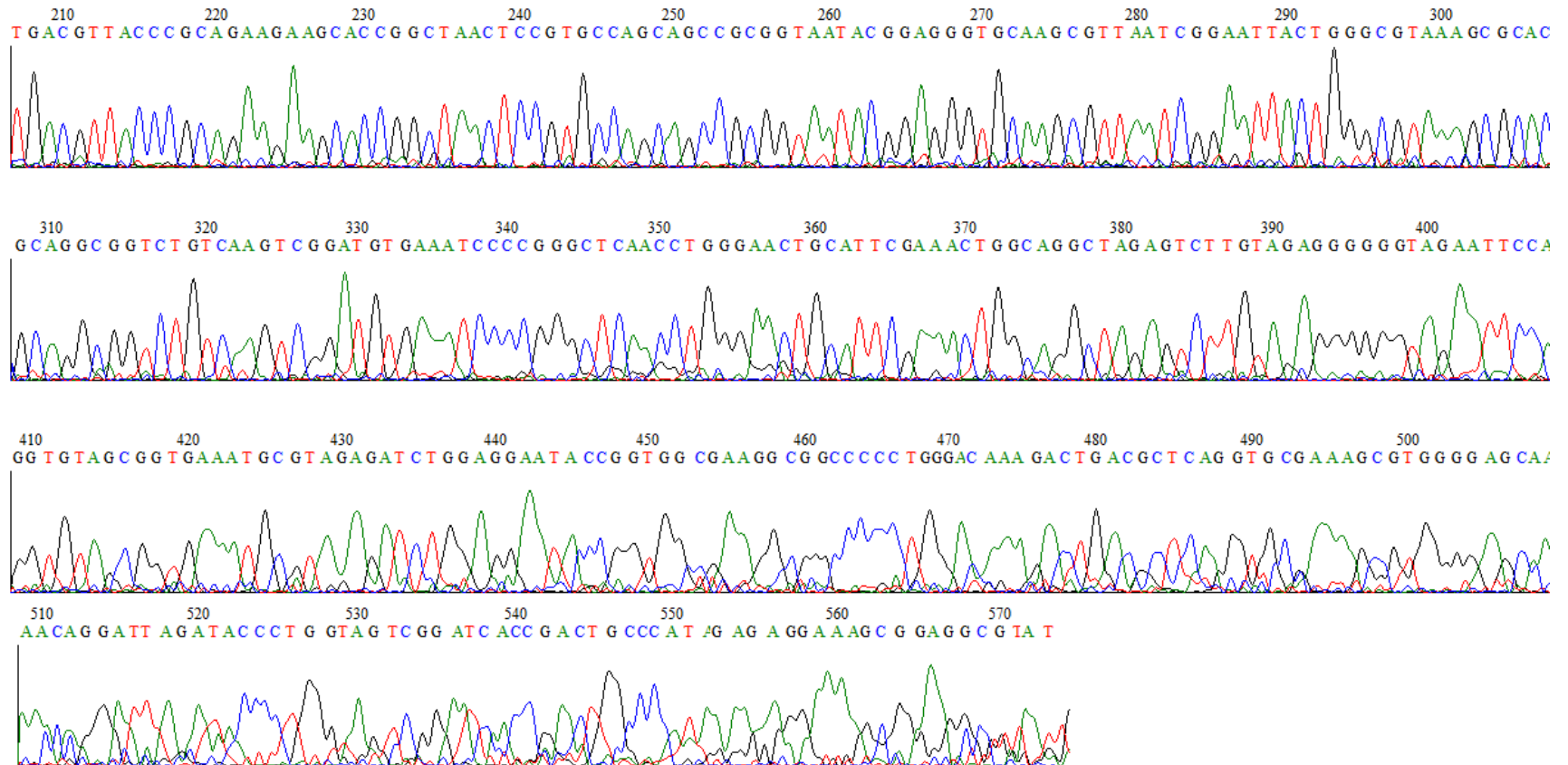
## ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4203R – SECUENCIA REVERSE

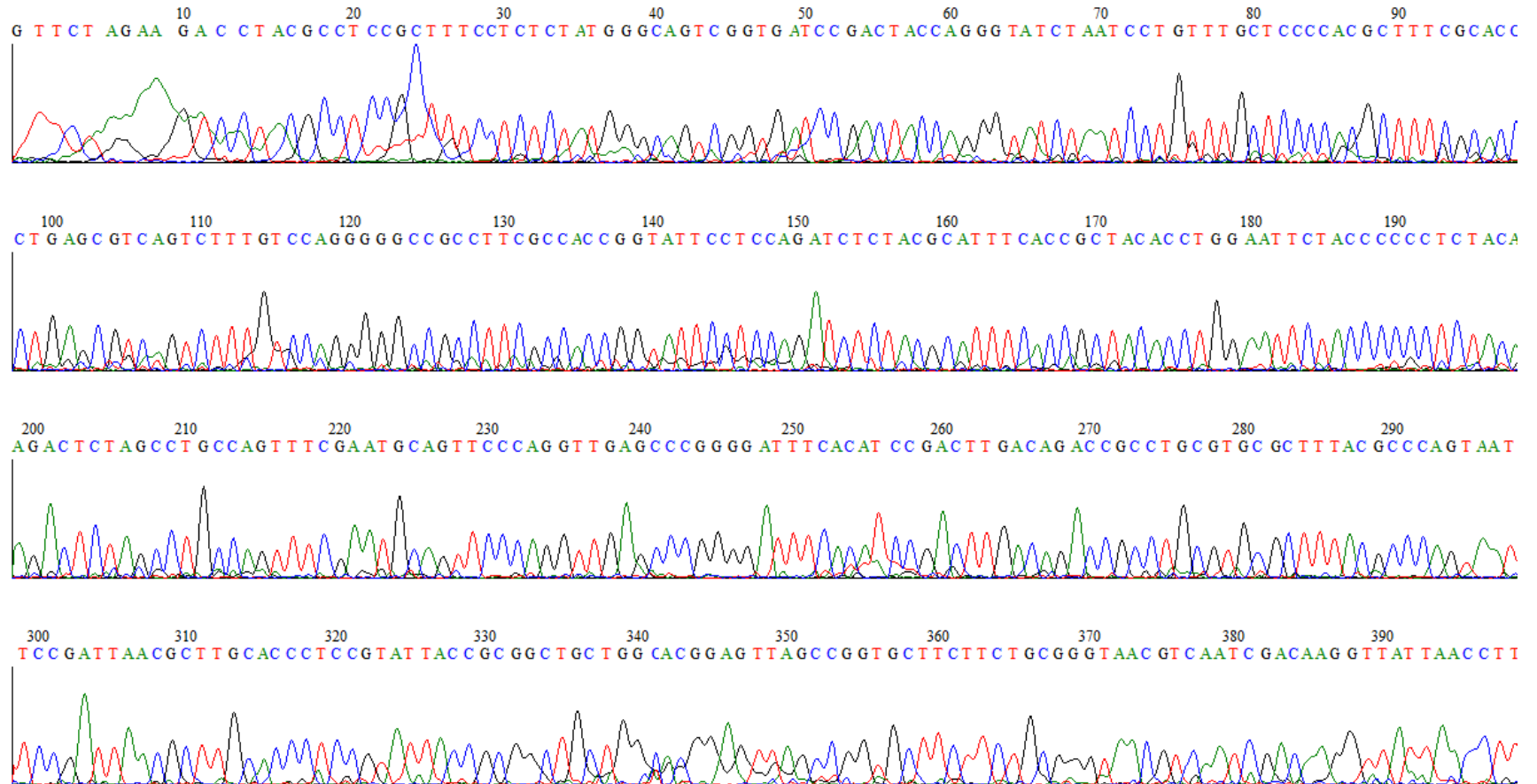


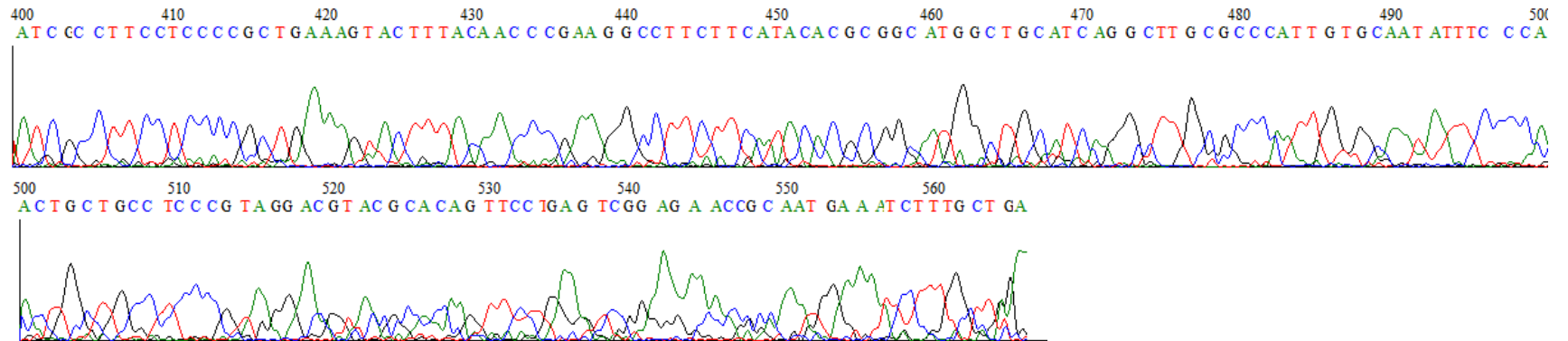


### ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4204F – SECUENCIA FORWARD

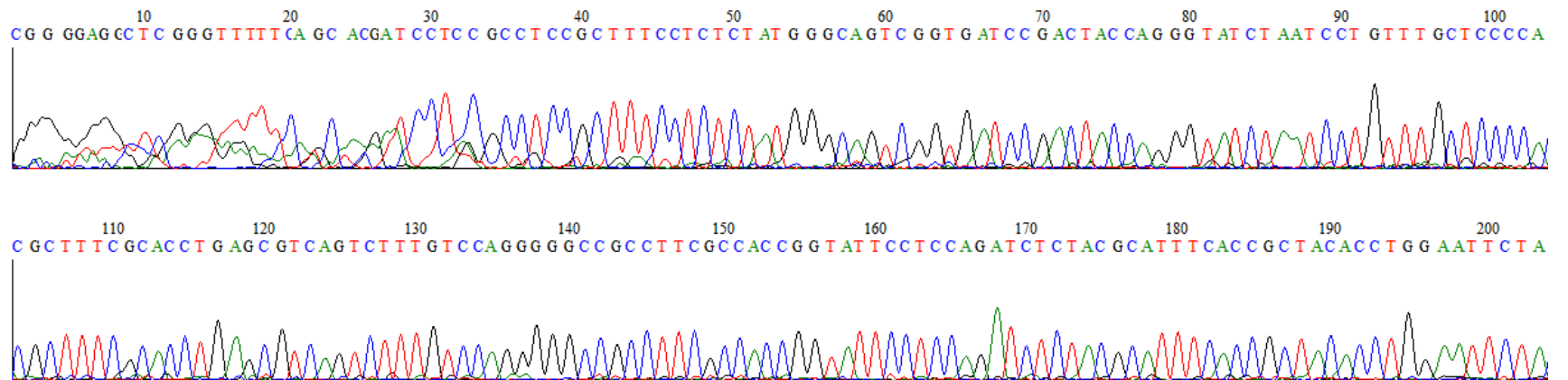


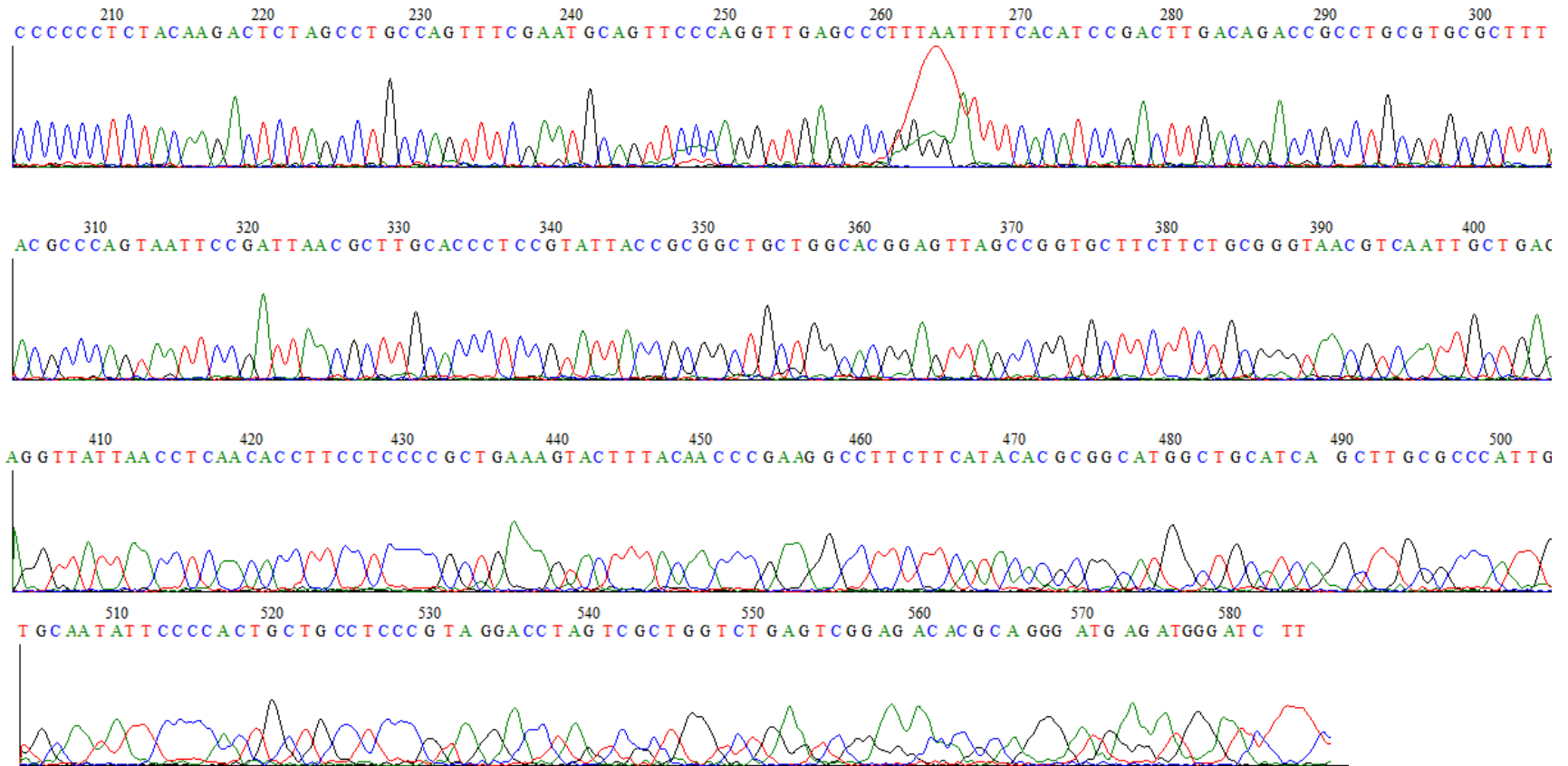


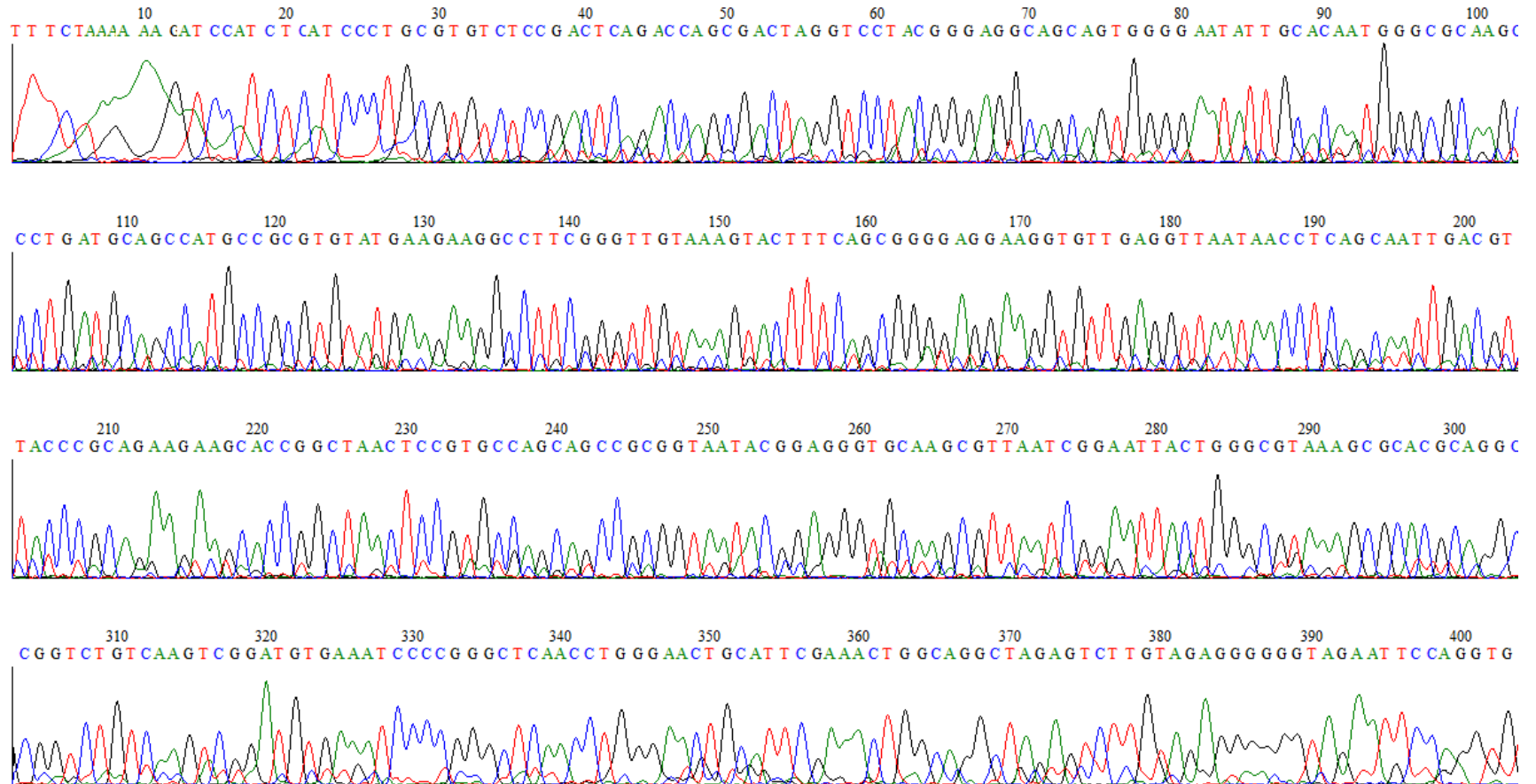
**ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4204R – SECUENCIA REVERSE**

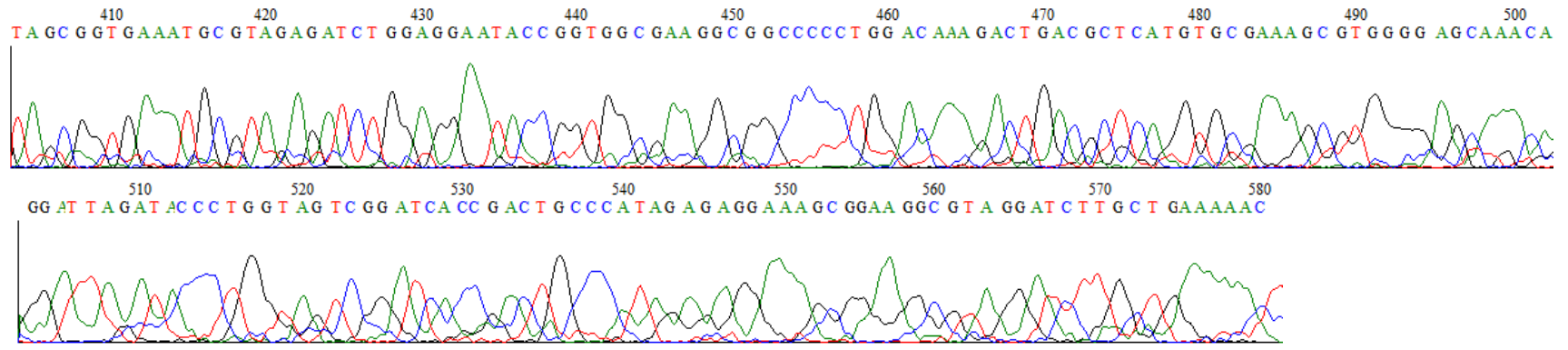


### ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4208F – SECUENCIA FORWARD

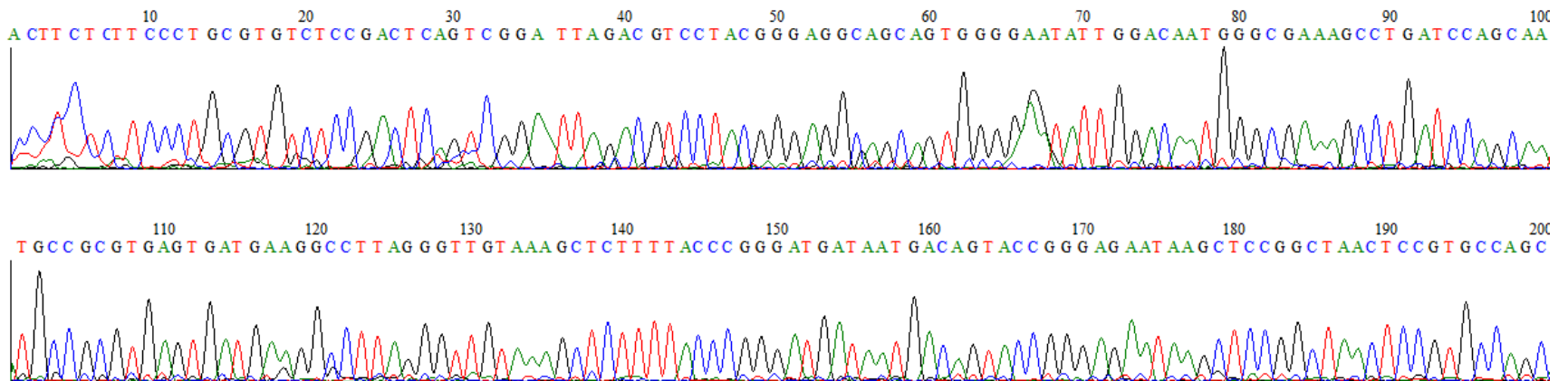




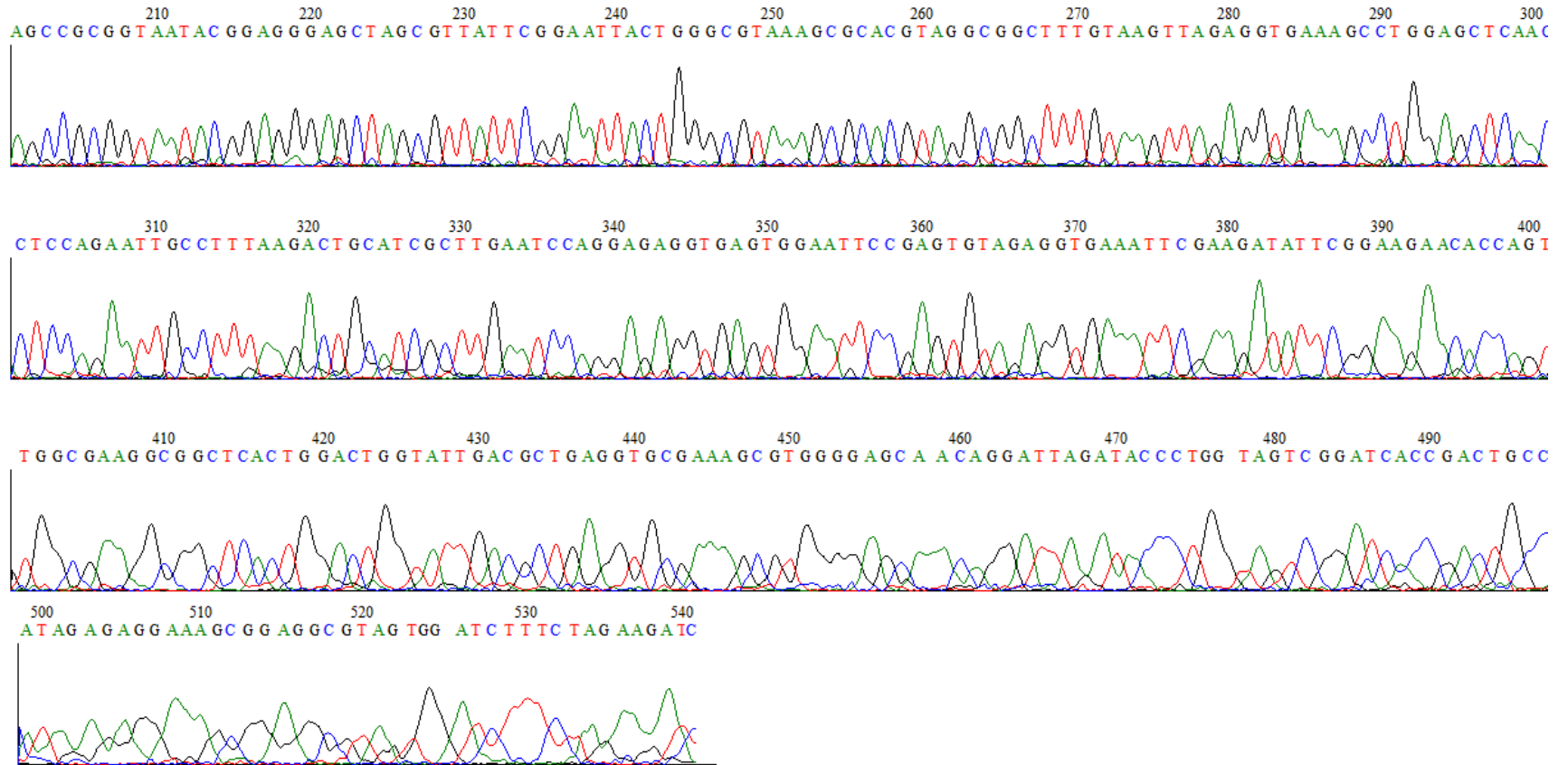
**ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4208R – SECUENCIA REVERSE**

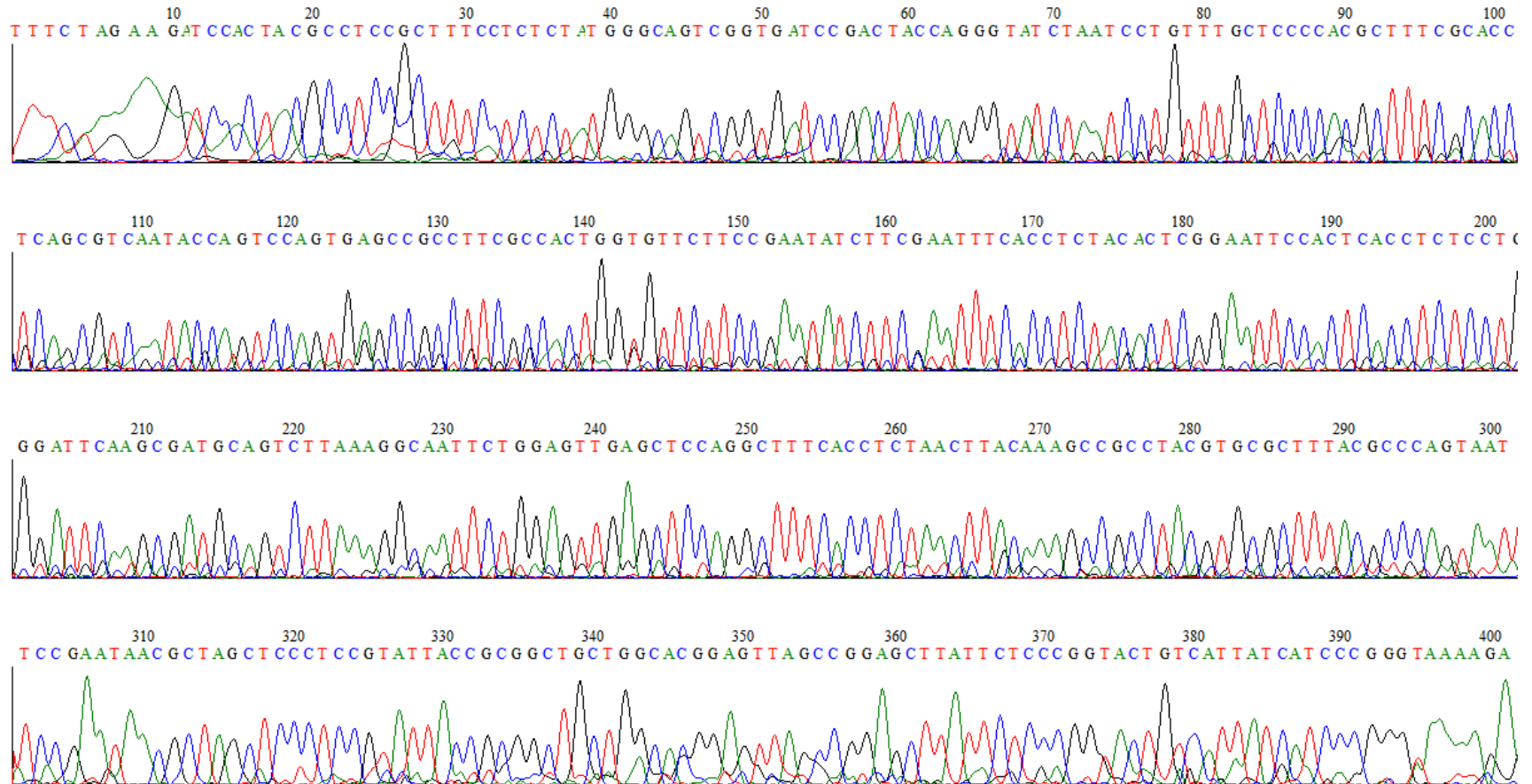


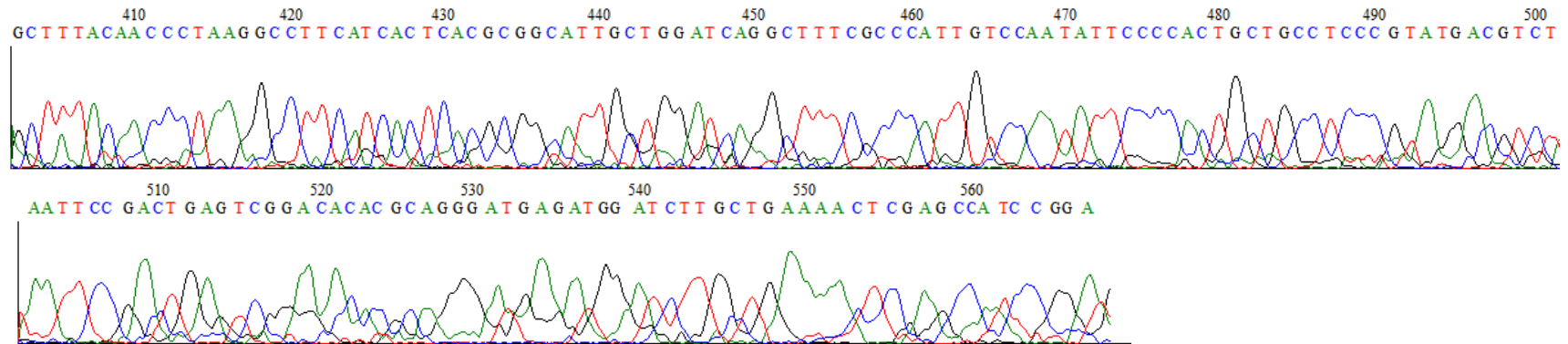
### ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4502F – SECUENCIA FORWARD



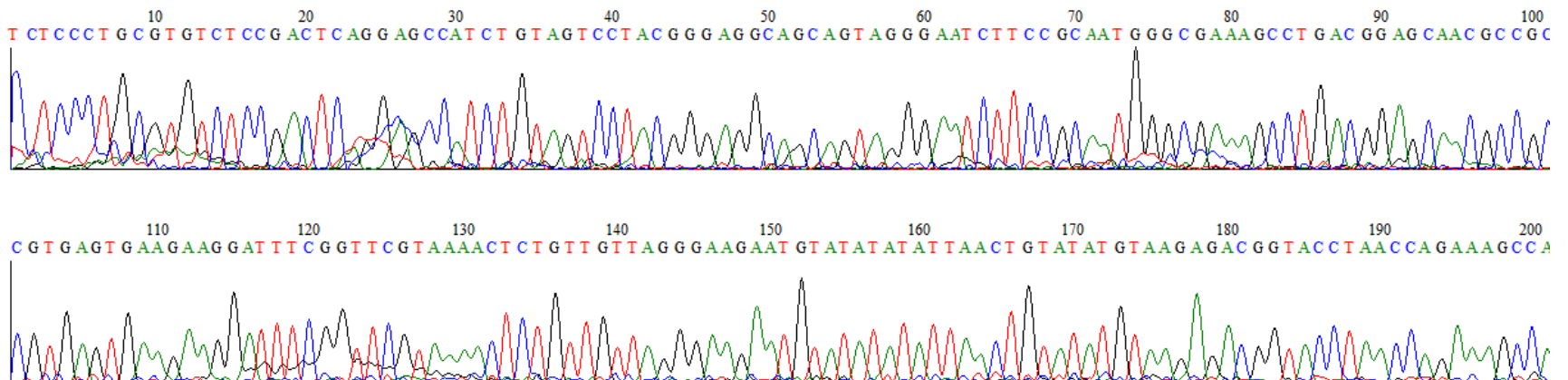


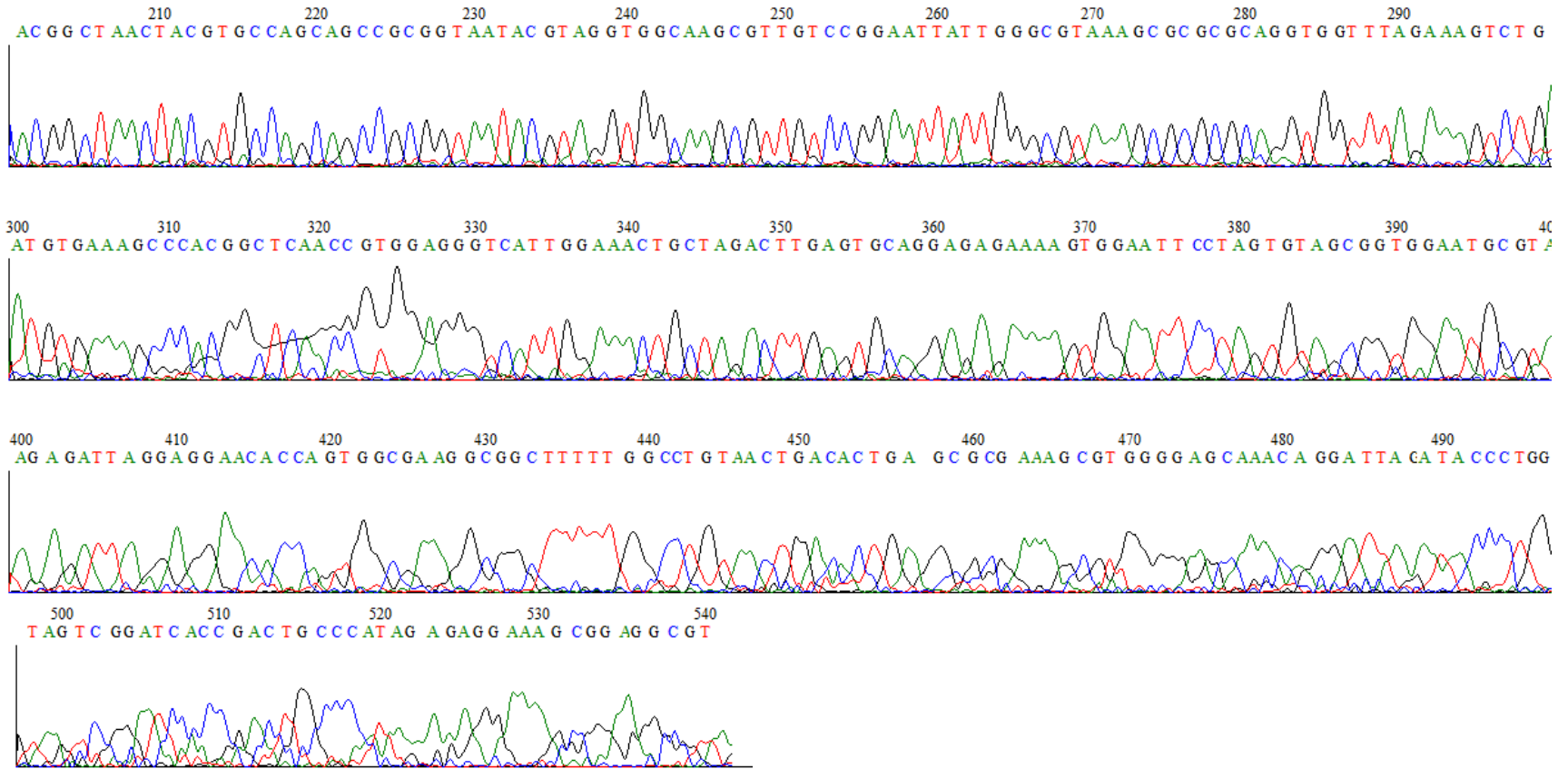


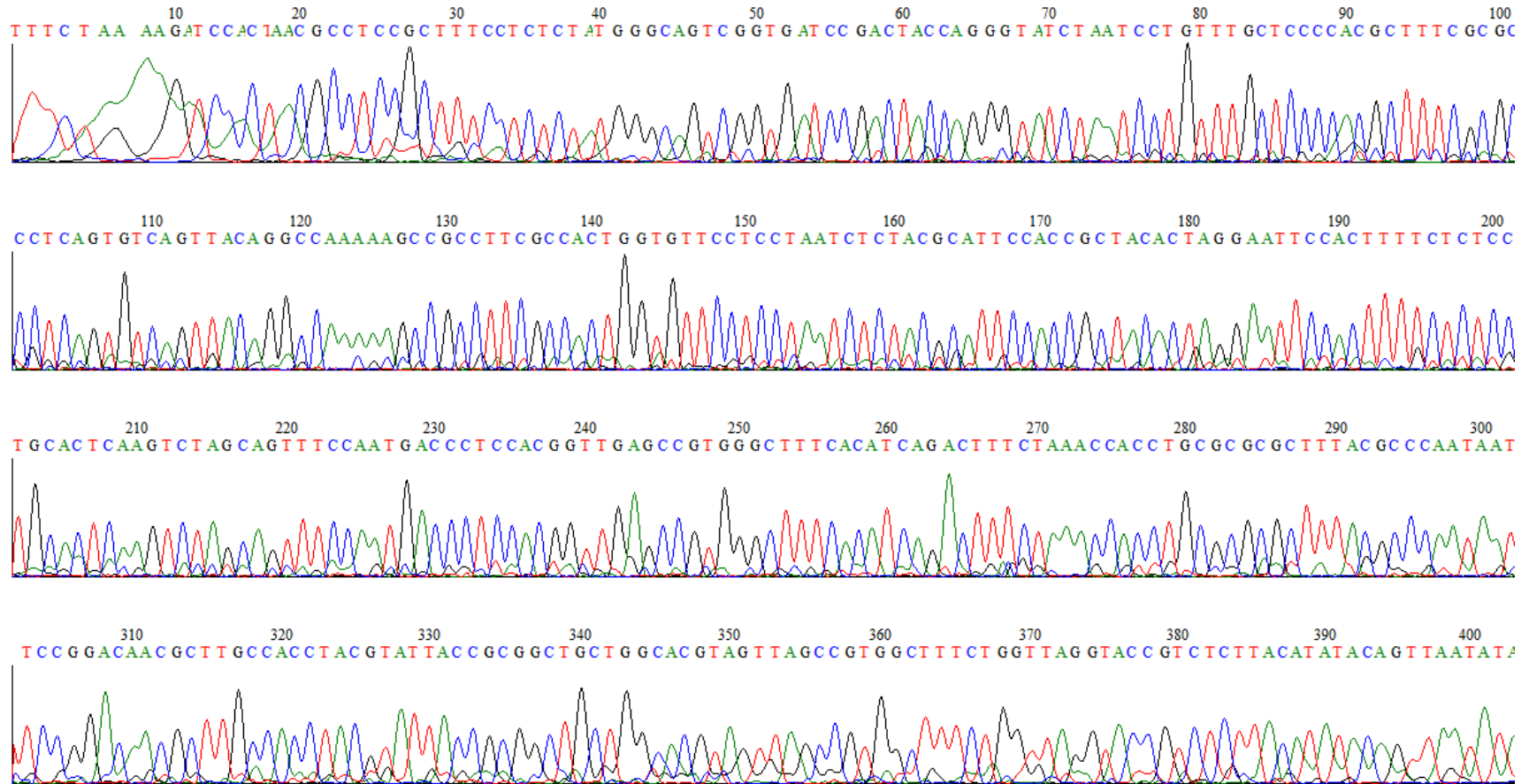
**ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4502R – SECUENCIA REVERSE**

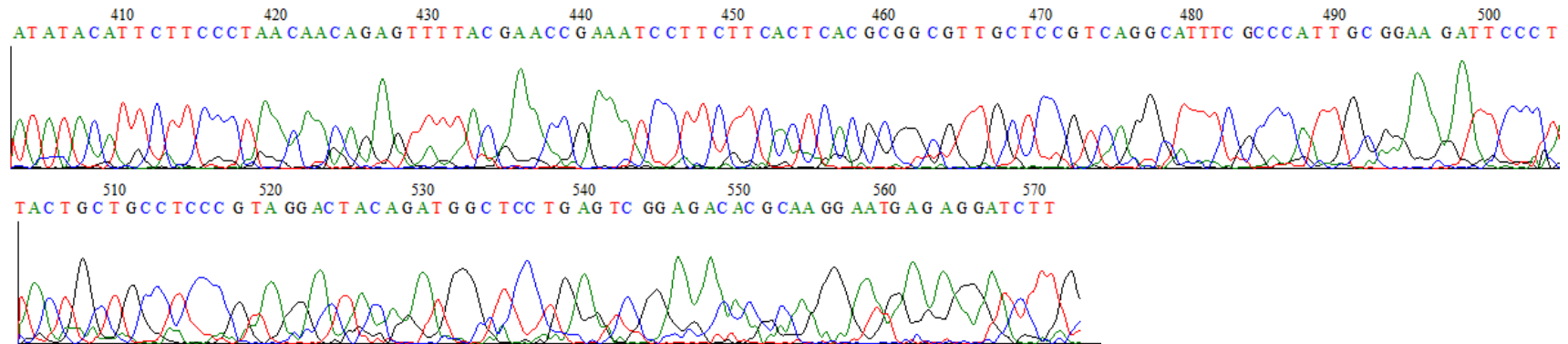


### ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4503F – SECUENCIA FORWARD

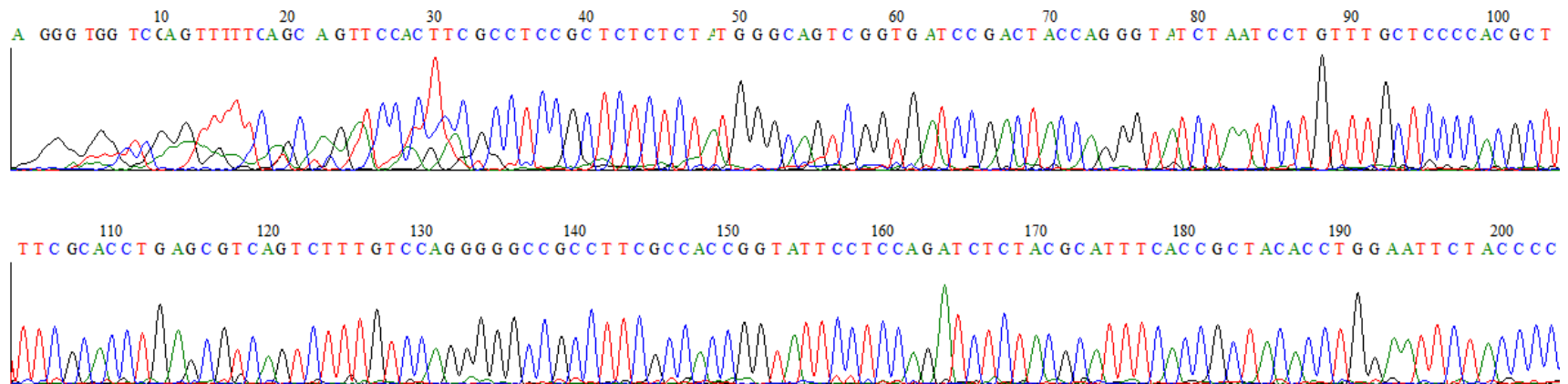


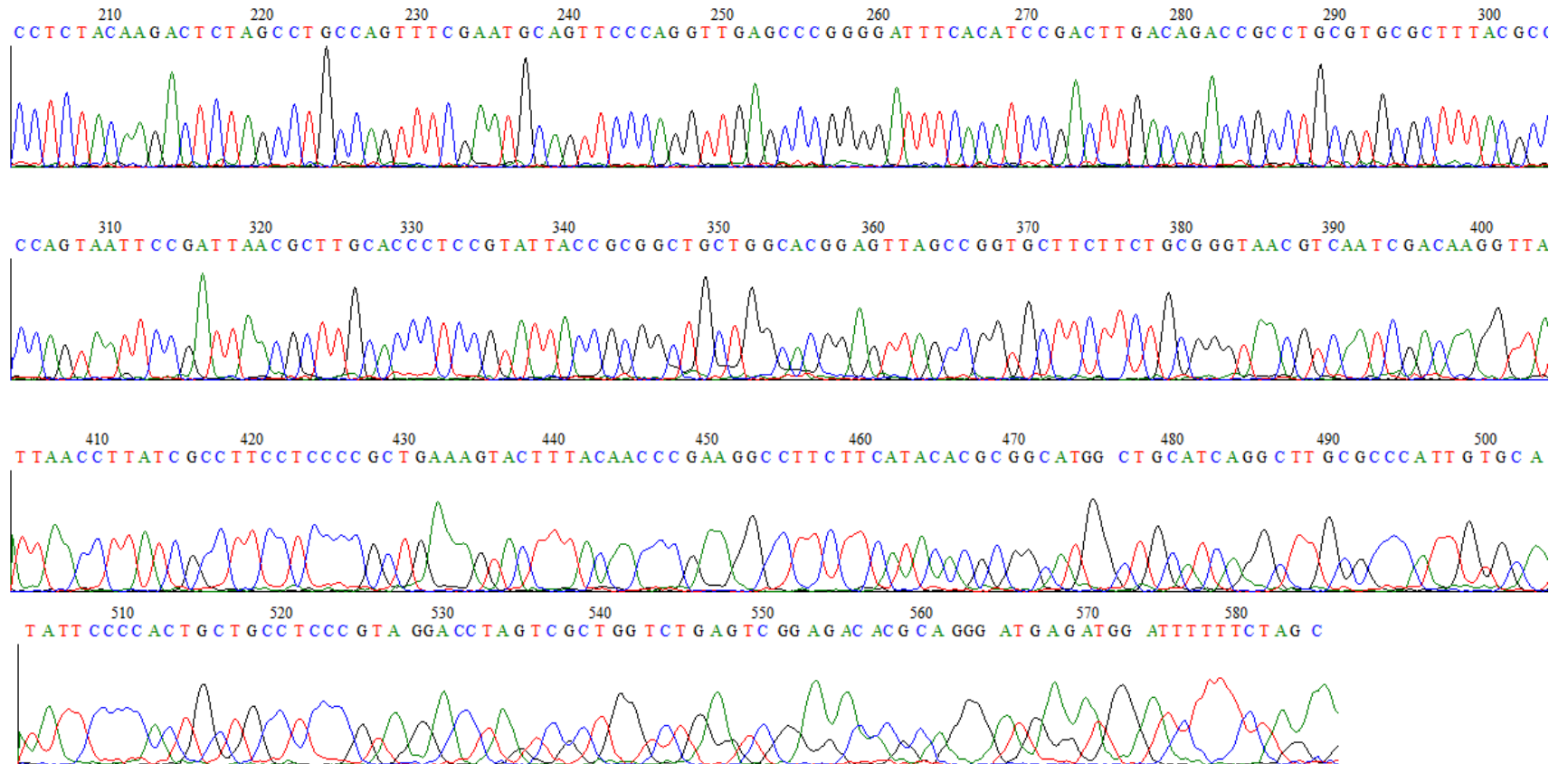


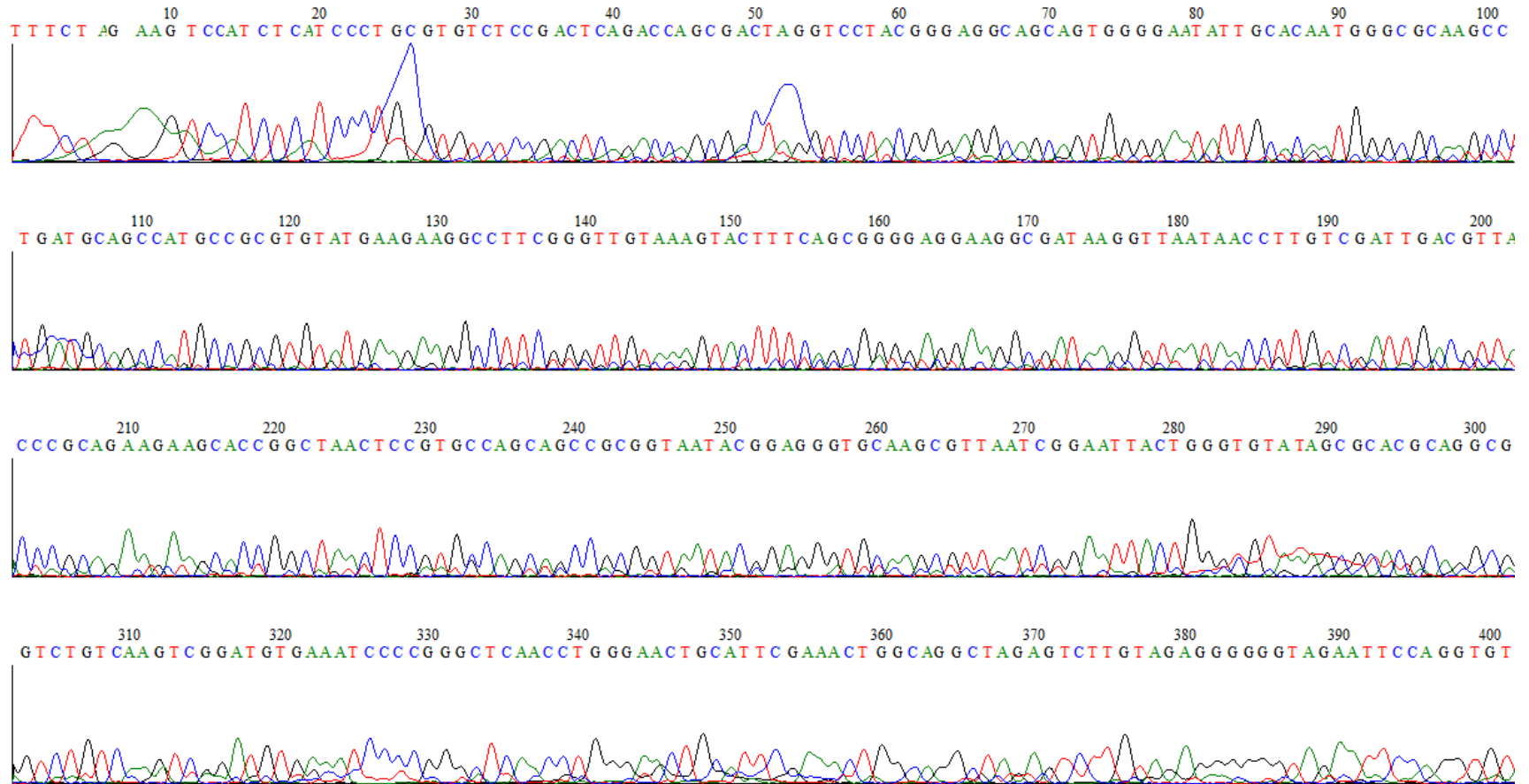
**ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4503R – SECUENCIA REVERSE**



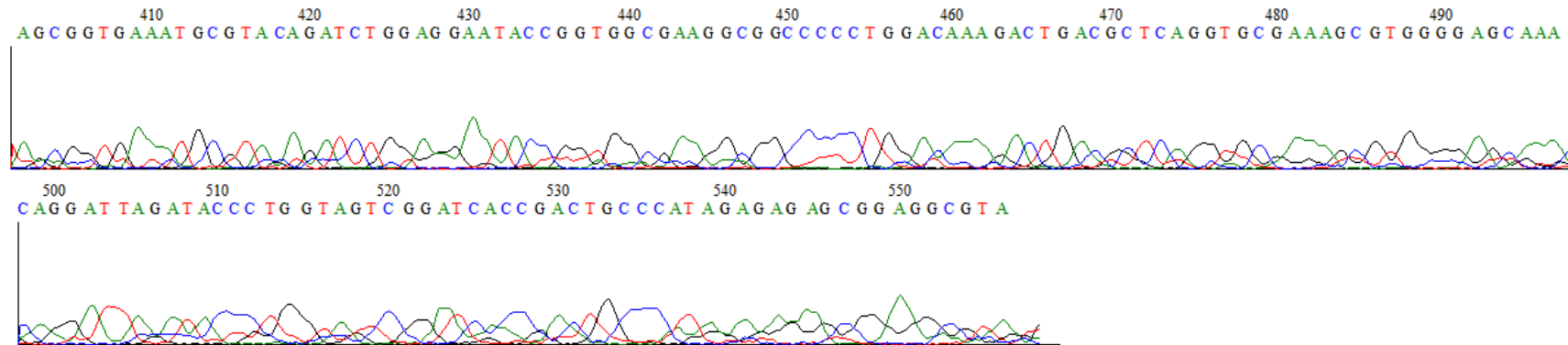
### ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4504F – SECUENCIA FORWARD





**ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA CV3V4504R – SECUENCIA REVERSE**





**SECUENCIAS CONSENSO (SECUENCIA OBTENIDA DEL ALINEAMIENTO DE SECUENCIA FORWARD Y REVERESE COMPLEMENTARIA, DELIMITADA POR INICIADORES CGO465, ALINEAMIENTO CON BLAST) OBTENIDAS EN VECTOR NTI 11.**

**CV3V4203**

CTACCCGGGCATCTAAGCCACGTTTGATACCCACGCTTTCGTGTTTCAGCGTCAGTTGTACCTTAGTAAGCTGCCTGCGCAATCGGAGTTCCT  
 AGTGATATATATGCATTTACCGCTACACCACGAATTCGCCTACCTCATCTACAGTCAAGTCCGCCAGTTTCAACGGCAATGTCTAGGTTGAG  
 CCCAAAATTTACCGCTGACTTAACAGACCGCCTACGCACCCTTAAACCCAATAAATCCGAATAACGCTCGCATCCTCCGTATTACCGCGGC  
 TGCTGGCACGGAGTTAGCCGATGCTTATTCATAGGGTACATTCACCTTAGTACGCGTACCAATCATTATTCCTTATAAAAGAAGTTGACAATC  
 CATAAGACCGTCATCCTTCACGCTGACTTGGCTGGTTCAGGCTCCCGCCAATGACCAATATTCGTCACTGCTGCCTCGAGTACGGAGTCAGC  
 TCGNTAACTCTGAGTCGGAGACACGCAA

**CV3V4204**

GTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT  
 AAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG  
 CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCCGGATGTGAAATCCC  
 CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG  
 ATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC  
 CCTGGTAG

**CV3V4208**

CAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGA  
 TCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTTCGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGT  
 GGATTTTCACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGC  
 TGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAA

**CV3V4502**

GTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGT  
 AAAGCTCTTTTACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGAGCT  
 AGCGTTATTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTTAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAATTGCCTTTA  
 AGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAATTCAGAGTGTAGAGGTGAAATTCGAAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGG  
 CGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG

**CV3V4503**

GTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAATGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTTCGGTTCCG  
 TAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAATGTATATATATTAAGTGTATATGTAAGAGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC  
 AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTAGAAAGTCTGATGTGAAAGCCCA  
 CGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGCTAGACTTGAAGTGCAGGAGAGAAAAGTGGAAATTCCTAGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGA  
 TTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGCCTGTAAGTGCAGTGCAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT  
 GG TAG

**CV3V4504**

CAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGA  
 TCTNTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTTCGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCG  
 GGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTACACCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGC  
 TGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAA

## RESULTADO DEL ALINEAMIENTO UTILIZANDO BLAST-NCBI

**Tabla 1.** Resultados del alineamiento de la secuencia consenso utilizando BLAST con los valores preestablecidos

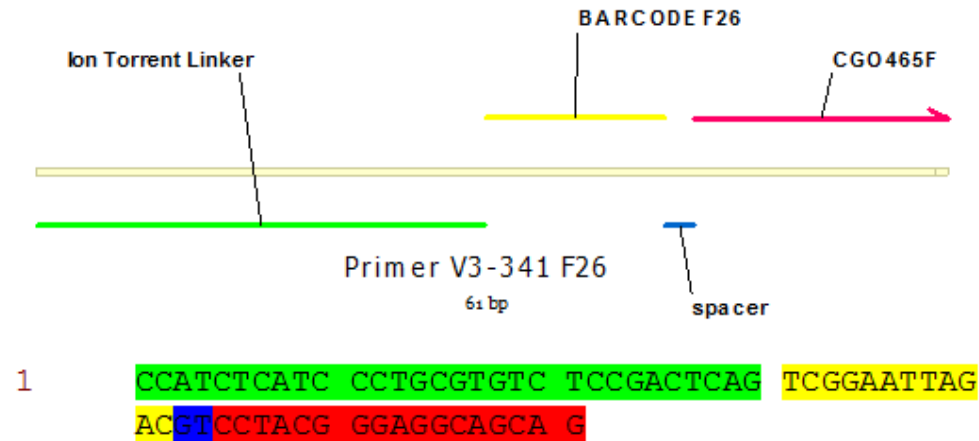
Secuencia	Resultado	Identidad (%)
CV3V4203	Uncultured <i>Porphyromonas</i> sp. clone Pig_H_E03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94
	Uncultured <i>Porphyromonas</i> sp. clone Pig_E_D11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93
	Uncultured bacterium clone 06OR02_7H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92
	Uncultured bacterium clone 06OR02_9F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92
	Uncultured bacterium clone 06OR02_6E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92
CV3V4204	Uncultured bacterium clone AD1F4F 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	Uncultured bacterium clone AD1F3Ga 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
	Uncultured bacterium clone BICP766 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	Uncultured bacterium clone BICP750 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	Uncultured bacterium clone BICP1333 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
CV3V4208	<i>Enterobacter cloacae</i> strain PR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	<i>Klebsiella</i> sp. UIWRF0501 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	<i>Enterobacter cloacae</i> strain ac3w3-1EMB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain BGCC 4205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain BGCC 2400 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
CV3V4502	<i>Sphingomonas</i> sp. HP9M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	Uncultured <i>Sphingomonas</i> sp. gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: CLZX111	99
	<i>Sphingomonas</i> sp. VITPTHJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	<i>Sphingomonas</i> sp. Hc_08N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	<i>Sphingomonas</i> sp. Hc_07N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
CV3V4503	Uncultured bacterium clone ncd2007g10c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
	Uncultured bacterium clone ncd1521f03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
	Uncultured bacterium clone nck144e11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97
	Uncultured bacterium clone nck139e02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97

	Uncultured bacterium clone nck138g02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97
CV3V4504	Uncultured bacterium clone 218002-352 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	Uncultured organism clone ELU0110-T273-S-NI_000046 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain BGCC 4205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain BGCC 2400 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
	<i>Enterobacter hormaechei</i> strain BGCC 4202 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99

## OLIGOS PARA SECUENCIACIÓN SEMICONDUCTORA DE IONES IDENTIFICADOS EN SECUENCIAS FORWARD Y REVERSE.

**Tabla 2.** Se muestran las secuencias de oligos que se pudieron identificar en tres secuencias, de los oligos V3-341 se identificaron tres “barcodes” diferentes. El oligo V4-805R se localizó en las tres secuencias.

Secuencia	Nombre del Primer	Ion Torrent “Linker”	Barcode (GOLAY)	Espaciador	Primer 16S rRNA (5' – 3')
CV3V4204F	V3-341 F40	CAAANATTTTCNTTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACTGTGCGTAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
CV3V4502F	V3-341 F26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGGAATTAGAC	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
CV3V4503F	V3-341 F22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	GAGCCATCTGTA	GT	CCTACGGGAGGCAGCAG
CV3V4-R	V4-805R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	-	CC	GACTACCAGGGTATCTAATCC



**Fig. 6** Estructura de un iniciador para secuenciación masiva semiconductor de iones. Iniciador V3-341F26, la línea verde representa la secuencia correspondiente al “Ion Torrent Linker” la línea amarilla corresponde al “Barcode” diferente para cada muestra, la línea azul corresponde a un espaciador GT y la línea roja representa el iniciador CGO 465F.

1 CCATCTCATC CCTGCGTGTC TCCGACTCAG AACTGTGCGT  
ACGT CCTACG GGAGGCAGCA G

Estructura del iniciador para secuenciación masiva semiconductor de iones V3-341F40.

1 CCATCTCATC CCTGCGTGTC TCCGACTCAG GAGCCATCTG  
TAGT CCTACG GGAGGCAGCA G

Estructura del iniciador para secuenciación masiva semiconductor de iones V3-341F22.