



**Centro de Investigación y de Estudios  
Avanzados del Instituto Politécnico  
Nacional**

Unidad Zacatenco

**Departamento de Genética y Biología molecular**

“Influencia de la microbiota vaginal sobre la expresión de  
citocinas proinflamatorias y la sobreexpresión de la enzima  
inmunoreguladora IDO en etapas tempranas de la  
carcinogénesis cervical”

Tesis que presenta:

**B.E. Aída Aidé Luna Pérez**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

en la especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Directores de Tesis:

**Dr. Jaime García Mena**

**Dr. Enoc Mariano Cortés Malagón**

Ciudad de México, México.

7/11/2018

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



Se agradece financiamiento CONACyT-163235 INFR-2011-01, and FONSEC SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT-233361 para JGM, SEP-CONACYT-236767 para PGV y SEP-CONACYT-242506 para EMCM.

Se agradece la beca CONACyT de Maestría 613359 para Aída Aidé Luna Pérez.

En el Cinvestav se agradece el apoyo del Biol. Alberto Piña Escobedo por su asistencia técnica con los reactivos, al Sr. Rodrigo García Gutiérrez por su asistencia con el material del laboratorio y la asistencia administrativa de Viridiana Rosas Ocegueda.

## **Agradecimientos**

Agradezco al Cinvestav por permitirme formar parte de su alumnado y por el apoyo para realizar este trabajo.

Agradezco a las personas involucradas en la realización de este trabajo:

Dr. Jaime García Mena, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por transmitirme conocimientos, por su supervisión, orientación y su apoyo brindado en este trabajo. Pero sobretodo infinitas gracias por siempre creer en mí.

Dr. Enoc Cortés Malagón, por sus enseñanzas, por apoyarme, aconsejarme y guiarme durante todo este proceso.

Dr. Patricio Gariglio Vidal, por permitirme pertenecer a su laboratorio, por su tiempo dedicado a ese proyecto, por su asesoría y orientación brindada a lo largo de mi estancia en el Cinvestav.

A mi comité tutorial, Dr. Bulmaro Cisneros Vega, Dr. Carlos Hoyo Badillo y nuevamente al Dr. Patricio Gariglio Vidal, por su disponibilidad y apoyo en este proyecto.

A los integrantes del laboratorio 0 y 24 del Cinvestav, así como también a miembros del laboratorio Juárez que apoyaron este proyecto.

## Índice

1. Introducción y antecedentes	1
2. Justificación	12
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	13
4.1. Objetivo general	13
4.2. Objetivos específicos	13
5. Alcance	14
6. Metodología	15
6.1. Plan de trabajo	15
6.2. Diseño experimental y métodos	16
7. Resultados y discusión	22
8. Conclusión	35
9. Perspectivas	36
10. Bibliografía	37

## Índice de tablas

	Página
Tabla 1 Relación de términos de citologías cervicales	42
Tabla 2 Poblaciones microbianas abundantes en disbiosis vaginal	42
Tabla 3 Características fenotípicas y parámetros visuales de las cepas K14E7 y FvB	43
Tabla 4 Concentraciones de DNA de muestras provenientes de lavados vaginales	43
Tabla 5 Secuencias barcodes utilizados para la construcción de la genoteca para la secuenciación de la región polimórfica V3 del gen rDNA 16S	44
Tabla 6 Condiciones PCR barcodes para construcción de genoteca	45

## Índice de Figuras

	Página
Figura 1 Mapa representativo de incidencia mundial del CaCu	46
Figura 2 Microscopia de diferentes tejidos cervicales	46
Figura 3 VPH y ciclo celular	47
Figura 4 Participación del estrógeno en vías celulares	47
Figura 5 Composición de la microbiota del tracto genital femenino	48
Figura 6 Esquema de plan de trabajo experimental	48
Figura 7 Representación genotípica y fenotípica del transgen de la cepa K14E7	49
Figura 8 Diagrama de tratamiento E <sub>2</sub>	50
Figura 9 Relación de los valores de Ct vs Log <sub>10</sub> UFC/mL de cultivo de <i>Escherichia coli</i> SK10019	50
Figura 10 Histopatología y expresión de PCNA en tejido cervical	51
Figura 11 Citología vaginal por medio de tinción Hematoxilina-Eosina	51
Figura 12 Comprobación de métodos de extracción de proteínas	52
Figura 13 Intensidad Media de Florescencia de Interleucinas	52
Figura 14 Intensidad Media de Florescencia de Interferones	53
Figura 15 Intensidad Media de Florescencia de TNF- $\alpha$ , GM-CSF y MCP-1	53
Figura 16 Citocinas IL-23 e IL-1 $\alpha$ en microbiota vaginal modificada	54
Figura 17 Expresión deIDO en tejido cervicovaginal	54
Figura 18 Amplificación de la región V3-V4 del gen ribosomal16s	55
Figura 19 Ejemplo de amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S usando los primers Barcodes	56
Figura 20 Datos de abundancia relativa de microbiota vaginal de lavados vaginales por grupo	56
Figura 21 Análisis de Diversidad	57
Figura 22 Resultados de análisis LefSe de datos secuenciados	57

## Abreviaturas

Ab	Anticuerpo
ATB	Antibiótico
CaCu	Cáncer Cervicouterino
Ct	Ciclo umbral
IFN- $\gamma$	Interferón Gamma
IL	Interleucina
MFI	Intensidad Media de Fluorescencia
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
ORF	Marco de Lectura abierto
Rb	Retinoblastoma
RE	Receptor de estrógenos
SI	Sistema Inmune
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
VB	Vaginosis Bacteriana
VPH	Virus del Papiloma Humano

## Resumen

El Cáncer Cervicouterino (CaCu), es una enfermedad multifactorial en la que el principal factor de riesgo es la infección persistente por el Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo (VPH-AR). Sin embargo, la infección por VPH es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de CaCu, por lo que se consideran importantes otros factores de riesgo, entre los cuales podría estar la microbiota vaginal.

Por otro lado, se ha descrito que el CaCu se ve acompañado de inflamación crónica incluso desde etapas tempranas del proceso de carcinogénesis. El proceso inflamatorio puede surgir como respuesta a diversos estímulos, entre los que se encuentra la microbiota. Dicho proceso se ve acompañado de la expresión de citocinas proinflamatorias, que a su vez, pueden desencadenar diversos mecanismos como apoptosis, proliferación, angiogénesis, inflamación, invasión, etc. Así como también la expresión de otros genes, entre los que se encuentra la enzima inmunoreguladora indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la cual mediante su actividad puede regular la proliferación y activación de otras poblaciones inmunes, como las células T y de esta manera contribuir a un ambiente inmunosupresor o favorecer la carcinogénesis cervical.

En este trabajo evaluó la influencia que tiene la microbiota vaginal en la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, IL-23, IL-27, MCP-1, INF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF), la expresión de IDO y de PCNA en etapas tempranas de la CaCu en ratones FvB, K14E7+E<sub>2</sub> y K14E7+E<sub>2</sub>+ATB (mezcla de antibióticos). Se evaluó su influencia de la microbiota, disminuyendo la carga bacteriana mediante el uso de coctel de antibióticos (ATBs) usados localmente en la vagina de los ratones. Se encontró que la microbiota vaginal de los diferentes grupos estudiados difieren entre ellos, encontrándose disminución de especies pertenecientes al género *Actinobacillus* y a la familia Pasteurellaceae en ratones K14E7+E<sub>2</sub> y un aumento de especies del género *Enterobacteriaceae* y *Gemellaceae*. Así como también se observó que la microbiota vaginal del grupo K14E7+E<sub>2</sub>+ATBs se parece a la microbiota del ratón FvB, aunque presenta mayor diversidad de especies. Se determinó que la familia Gemellaceae y el género *Roseburia* se encuentran significativamente abundantes en el grupo K14E7+E<sub>2</sub> con respecto al grupo control. También se encontró una disminución de la expresión de PCNA en los ratones K14E7+E<sub>2</sub>+ATB en comparación con los ratones K14E7+E<sub>2</sub> sin ATB. Asimismo, se detectó modificación de la expresión de IDO y de las citocinas IL-23, IL-1 $\alpha$  e IL-17 de los ratones K14E7+E<sub>2</sub> con respecto a los FvB. Cuando se aplica el tratamiento de ATBs al grupo K14E7+E<sub>2</sub>, se observa una ligera disminución de IL-1 $\alpha$  e IL-23 y aumento significativo de IFN- $\gamma$  con respecto a los K14E7+E<sub>2</sub> sin ATBs.



## Abstract

Cervical Cancer is a multifactorial disease in which the main risk factor is the persistent infection with High Risk Human Papillomavirus (HR-HPV). However, HR-HPV infection is necessary but not enough for the development of cervical cancer, and we must consider other important risk factors; among which could be the vaginal microbiota.

On the other hand, it has been described that cervical cancer is accompanied by chronic inflammation even from early stages of the carcinogenesis process. The inflammatory process may arise in response to various stimuli, among which is the microbiota. This process is characterized by the expression of proinflammatory cytokines, which, in turn, can trigger various mechanisms such as apoptosis, proliferation, angiogenesis, inflammation, invasion, etc. As well as the expression of other genes, among which is the immunoregulatory enzyme indolamine 2,3-dioxygenase (IDO), which can regulate the proliferation and activation of other immune cell populations, and in this way contribute to the immunosuppressive environment that favor cervical carcinogenesis.

In this work, we evaluate the influence of the vaginal microbiota on the expression of proinflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, IL-23, IL-27, MCP-1, INF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and GM-CSF), the expression of IDO and PCNA at early stages of cervical cancer in FvB, K14E7+E<sub>2</sub> and K14E7+E<sub>2</sub>+ATB-C mice. The microbiota influence was evaluated by decreasing the bacterial load using an antibiotic cocktail (ABT-C) locally, modifying the vaginal microbiota. It was found that, the vaginal microbiota of the different studied groups differed among them, finding decrease of species of the *Actinobacillus* genus and the Pasteurellaceae family in K14E7+E<sub>2</sub> mice and an increase of species of the *Enterobacteriaceae* and *Gemellaceae* genus as compared with FvB mice. It was detected that the vaginal microbiota of the K14E7+E<sub>2</sub>+ATB-C mice resembles the microbiota of the FvB mice, but the FvB microbiota has a greater diversity of bacteria. The Gemellaceae family and the *Roseburia* genus were more abundant in the K14E7+E<sub>2</sub> mice with respect to the control group. Decrease PCNA expression was found in the cervix of K14E7+E<sub>2</sub>+ATB-C mice compared to K14E7+E<sub>2</sub> mice without ATB-C. Likewise, high expression of IDO and the cytokines IL-23, IL-1 $\alpha$  and IL-17 was detected in cervico-vaginal tissue of K14E7+E<sub>2</sub> mice with respect to FvB mice. When the treatment of ATB-C was applied to the K14E7+E<sub>2</sub> mice, a slight decrease of IL-1 $\alpha$  and IL-23 and a significant increase of IFN- $\gamma$  are observed with respect to K14E7+E<sub>2</sub> mice without ATB-C.

## 1. Introducción y antecedentes

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una enfermedad multifactorial, en la que la regulación celular del tejido cervical se pierde, ocasionando proliferación descontrolada, lo que conlleva a la formación de tejidos anormales. El CaCu representa un grave problema de salud, debido a que a nivel mundial es la séptima neoplasia en general y entre las mujeres es la cuarta causa de cáncer más frecuente, generando anualmente 528,000 nuevos casos diagnosticados, de los cuales 266,000 son defunciones. El 85% de los casos registrados son en países en vías de desarrollo; es decir, nuestro país es uno de los países afectados por esta patología, representando la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Las entidades con mayor mortalidad por cáncer de cuello uterino son Morelos (18.6%), Chiapas (17.2%) y Veracruz (16.4%) (GLOBOCAN, 2012) (Figura 1).

El CaCu anatómicamente, generalmente se desarrolla en la zona de transformación de la unión escamo columnar del cuello uterino, a partir de lesiones precursoras después que haya ocurrido infección por el virus del papiloma humano de Alto Riesgo (VPH-AR), el principal factor de riesgo. La carcinogénesis cervical implica el paso y progreso de diferentes tipos de lesiones para poder avanzar a CaCu. Estas lesiones se clasifican por la condición del revestimiento de células anormales del cuello uterino o cérvix en leve, moderado y alto; es decir, Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) 1, 2 y 3 (Richart *et al.*, 1968) (Figura 2).

El diagnóstico de NIC se lleva a cabo por examen histopatológico al microscopio de una biopsia de células cervicales. En general las NICs se caracterizan por que las células del epitelio cervical presentan un núcleo voluminoso (mayor coloración nuclear), polimorfismos nucleares y poco citoplasma. Cada tipo de NIC difiere es definido por el espesor del epitelio con células de las características anteriormente mencionadas. Existe otro

sistema de clasificación de las citologías cervicales o lesiones cervicales por el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. propuesto en 1992, denominado Bethesda (Tabla 1).

Existen varios tipos de CaCu entre los que predominan el escamoso, el adenocarcinoma y otros menos frecuentes como sarcomas y melanomas malignos primarios de cuello uterino (Liu *et al.*, 2014).

Sin embargo, el CaCu es prevenible bajo un diagnóstico a tiempo, es decir si es detectado en etapas tempranas o en lesiones precancerosas. El 90% de las infecciones por VPH son regresivas en un periodo de 6-18 meses y cuando existe una infección persistente suele progresar a NIC (Crosbie *et al.*, 2013; Castle *et al.*, 2009). En NIC I y II, existe displasia leve a moderada respectivamente y en estos periodos ocurren importantes cambios a nivel celular y fisiológico, los cuales son de interés científico y clínico. Estas lesiones precancerosas cervicouterinas se encuentran relacionadas a procesos inflamatorios crónicos, en donde se ha descrito la presencia de citocinas pro-inflamatorias, incluyendo interleucinas (ILs) y el factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales son mediadores importantes de la inflamación de las células epiteliales y de la mucosa. En este contexto, los queratinocitos son los principales contribuyentes a la producción de citocinas epidérmicas en respuesta a diversos estímulos, incluida la infección viral por VPH (Mitra *et al.*, 2016).

### Virus del Papiloma Humano

Los papilomavirus comprenden un grupo diverso de virus de doble cadena de ADN que infectan a seres humanos y a otros animales, induciendo neoplasias epiteliales. Su origen data de aproximadamente 350 millones de años, desde entonces han estado co-evolucionando junto con su huésped (Bravo *et al.*, 2010). Estructuralmente las partículas de papilomavirus comparten una estructura icosaédrica no envuelta (50-60 nm de diámetro). La cubierta del virus contiene 360 moléculas de proteína L1

(tienen estructura tipo “beta-jellyroll”) dispuestas en 72 capsómeros (cada uno compuesto de 5 moléculas de L1) (Schiller *et al.*, 1996). Las interacciones entre los capsómeros requieren la cola C-terminal de la proteína L1, que se extiende hacia los capsómeros vecinos e interactúa por enlaces disulfuro (Chen *et al.*, 2000). La proteína L2, no está expuesta en la superficie del virión hasta en la infección, en donde se une con la matriz extracelular. Esta proteína se encuentra en un número variable.

Sus genomas comprenden episomas de aproximadamente 8000 pares de bases, que contienen ocho o nueve ORF (Marco de lectura abierto), que son designados como tempranos o tardíos. Dentro de los genes tempranos están E1, E2, E4, E5, E6, E7. E 1 y E2 son altamente conservados e involucrados en la replicación; E1 codifica para una helicasa de ADN específica del virus, necesaria para la replicación y amplificación del genoma viral, mientras que E2 regula la transcripción de las oncoproteínas virales E6 y E7. Los genes involucrados en el empaquetamiento son los genes tardíos L1 y L2, los cuales también están altamente conservados. Contrariamente, E6, E7, E5 y E4 no son tan conservados, estos genes tienen funciones en la regulación del ciclo celular, evasión inmune, y la liberación de virus (Doorbar *et al.*, 2012).

Las oncoproteínas E6 y E7 están relacionadas al control de la progresión del ciclo celular, atribuyéndoles los papeles más importantes en la carcinogénesis cervical (Hawley *et al.*, 1989; Munger *et al.*, 1989). Las proteínas de estos genes se unen a proteínas de la célula hospedera, como lo son las proteínas supresoras de tumor p53 y Retinoblastoma (Rb) hipofosforilada respectivamente, las cuales posteriormente pueden ser degradadas (Huibregtse *et al.*, 1993, zhaffner *et al.*, 1995). Estudios de CaCu en modelos de ratón transgénico que expresan la oncoproteína E7 (K14E7), se observó un aumento de proliferación, número de copias del centrosoma y la inducción de la progresión de cánceres microinvasivos; mientras que el ratón que expresa la oncoproteína E6 (K14E6), presentó aumento de número de copias de centrosomas y degradación de p53, pero no se observaron

neoplasias ni cáncer y por lo tanto no hubo microinvación (Riley R.R. *et al.*, 2003). Por lo tanto, se determinó que la principal oncoproteína transformadora y que atribuye a desarrollo del CaCu es E7.

La oncoproteína E7, es una proteína de 98 aminoácidos compuesta por tres dominios conservados: CD1, CD2 y CD3, los cuales se han descrito que participan en la interacción con otras proteínas y sustratos celulares. Entre las proteínas con las que interactúa E7 están las proteínas de la familia de Rb, esta interacción se lleva a cabo por medio de un motivo de unión LXCXE en el dominio CD2. En este mismo dominio se encuentra el sitio de fosforilación CKII, el cual es importante para señal de progresión de la fase S. Rb en condiciones normales, no está fosforilada en fase temprana de G1, lo que le permite interactuar con factores de transcripción E2F (Dyson *et al.*, 1989). Bajo esta interacción Rb-E2F se limita la transcripción de genes regulados por E2F, ya que se encuentra interactuando con otra proteína, por lo que se restringe la transcripción de genes con promotores regulados por E2F, entre estos genes están algunos relacionados a síntesis de DNA. Sin embargo, en células que están infectadas que expresan E7, Rb no fosforilada se une a E7 y posteriormente sufre un proceso de degradación por medio de la vía ubiquitina-proteosoma. Las oncoproteínas E7 de diversos papilomavirus se unen a Cullin Ubiquitina ligasas y UBR4, lo que da lugar a la degradación de Rb mediada por ubiquitina (Demasi *et al.*, 2005; Huh *et al.*, 2007; Hugh *et al.*, 2005). De esta manera E2F queda libre, para transcribir sus respectivos genes, entre los que están CDK2 y las ciclinas A y E que son necesarias para la transición G1-S en el ciclo celular. Por lo que E2F, promoverá que las capas basales y parabasales entren en la fase S del ciclo celular. Por lo contrario, normalmente en el epitelio no infectado, la liberación de E2F depende de factores de crecimiento externos, que estimulan la actividad de ciclina D/cdk para permitir la fosforilación de pRb y la liberación de E2F (Bagchi *et al.*, 1990; Lechner *et al.*, 1992; Phelps *et al.*, 1988). También se ha descrito que E7 se une e inactiva a E2F6, la cual interactúa con el complejo de polycomb, por lo que modifica los perfiles

epigenéticos. Así como también se sabe que en el dominio CD3, E7 interactúa con proteínas celulares como inhibidores de las CDKs, p21 y p27. También se ha descrito que CD3 se une Mi2 $\beta$  del complejo histona deacetilasa (HDAC), lo que inhibe su actividad y conduce a la regulación positiva del gen E2F a través de la acetilación del promotor E2F (Zhang B *et al.*, 2004).

En cuanto a la malignidad que puede producir la infección del VPH, está la categoría de los virus de alto o bajo riesgo. Ello viene dado principalmente por su eficiencia de conducir proliferación robusta de las células basales y esto depende de la afinidad de unión a las proteínas con las que interactúan, mecanismo que favorece la proliferación, aumentando la presencia de marcadores como ki-67 y PCNA (Figura 3). La fuerza de interacción con sus proteínas blanco viene dada por los motivos antes mencionados, de esta manera un motivo característico de alto riesgo difiere del motivo de bajo riesgo (Zhang *et al.*, 2006). Un ejemplo de virus de alto riesgo es el VPH16, el cual resulta ser uno de los principales responsables de los carcinomas cervicales actuales (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012).

### Cáncer Cervicouterino y factores de riesgo

La infección persistente por el VPH es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de CaCu, es decir, es el agente etiológico; al ser de alto riesgo, es más factible que progrese a CaCu. Sin embargo, no todas las infecciones con VPHs de alto riesgo persisten o progresan a cáncer cervical, lo que sugiere que, aunque necesaria, la infección por VPHs no es suficiente para inducir el proceso oncogénico. Por lo tanto, se necesita la participación de otros factores relacionados con el medio ambiente o el paciente.

La sociedad de cáncer americana cita los siguientes factores de riesgo, como sucesos importantes que pueden participar en la carcinogénesis cervical:

- Tabaquismo
- Dieta deficiente en frutas y vegetales
- Sobrepeso
- Uso del dispositivo intrauterino (DIU)
- Múltiples embarazos
- Ser menor de 17 años en el primer embarazo
- Tener historial de familiares con CaCu
- Infección por *Chlamydia*
- Haber usado dietilestilbestrol (estrógeno no esteroideo sintético)
- El uso prolongado de anticonceptivos orales
- Inmunodepresión

Cabe mencionar, que, en los factores mencionados, dos de ellos hacen referencia al uso de estrógenos, es decir, juegan un papel determinante en el desarrollo de CaCu. También podemos ver que al igual que todas las enfermedades el SI juega un papel sumamente importante para que progrese o no la enfermedad, en este caso, para la carcinogénesis cervical, observándose alteraciones en el SI desde etapas tempranas de la carcinogénesis. También se considera un factor de riesgo la infección por *Chlamydia*, es decir la presencia de un microorganismo resulta en la repercusión de la carcinogénesis cervical. Actualmente se ha relacionado otro nuevo factor de riesgo, descrito como disbiosis bacteriana vaginal o clínicamente descrita como Vaginosis Bacteriana (VB). Sin embargo solo se encuentran correlaciones, ya que aún no se ha esclarecido su papel en la carcinogénesis cervical (Audiracet *al.*, 2016).

## Estrógenos

El epitelio escamoso cervical tiene receptores de estrógenos (RE) y responde a la administración crónica de estrógenos en forma de proliferación, resultando en una hiperplasia (Quarmby *et al.*, 1984). Este tipo de tejido, que es altamente sensible al estrógeno; en el ciclo menstrual, donde las células epiteliales cervicales proliferan, generan hiperplasia a medida que aumentan los niveles de estrógeno, siendo mayor el incremento de estrógenos en la ovulación y en la ruptura del folículo. Sin embargo, no se genera ningún cambio patológico (Chung *et al.*, 2010).

El estrógeno se une a sus receptores citosólicos / nucleares (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ) y al receptor de membrana GPR30 para ejercer sus funciones. Al unirse los estrógenos a los RE en el citoplasma, se puede inducir o no la heterodimerización de los receptores. Los RE $\alpha$  y RE $\beta$ , unidos a los estrógenos se trasladan al núcleo, donde activan o reprimen los genes diana mediante los mecanismos de la vía clásica o no clásica. En la vía clásica, RE se une a Elementos de Respuesta a Estrógenos (ERE) y modula la expresión de genes diana. La vía no clásica, se caracteriza por que el RE se une a los factores de transcripción AP1 o Sp1, los cuales, asociados con sus sitios de reconocimiento, modifican su función (Meng *et al.* 2004). Otro mecanismo de acción del estrógeno es por medio del receptor de membrana GPR30, un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G. Este mecanismo se caracteriza por transducir señales a vías como la de fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la vía de señalización de Ca<sup>2+</sup> (Chung *et al.*, 2010) (Figura 4).

La interacción de los estrógenos con LCR del VPH contiene elementos de respuesta hormonal que pueden ser estimulados por los estrógenos. Hay pruebas considerables de la cooperación entre el estrógeno y el VPH en el desarrollo del cáncer cervical en los seres humanos y en otros modelos de estudio (Gariglio P, *et al.* 2009, Piccini *et al.*, 1997). Sin embargo, el mecanismo por el cual el estrógeno aumenta la expresión génica del VPH sigue sin estar claro, aún más cuando en modelos murinos que carecen de la



LCR logran desarrollar mecanismos que conducen al desarrollo del CaCu. Un ejemplo de ello es el modelo murino K14E7, que bajo un tratamiento de 6 meses con  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), logra desarrollar CaCu. (Cortés *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2014).

### Microbiota, Cáncer cervicouterino e inflamación

Las células epiteliales se encuentran expuestas a la interacción microbio-huésped y se relacionan directa o indirectamente a una amplia gama de enfermedades incluyendo el CaCu; por tanto, juega un papel importante en la adquisición y persistencia de la infección por el VPH (Boccardo *et al.*, 2010 y Sender *et al.*, 2016). Existen estudios que muestran que la microbiota vaginal en mujeres VPH positivas difiere en comparación con mujeres VPH negativas (Audirac *et al.*, 2016, Mitra *et al.*, 2016); los estudios que describen la microbiota vaginal en mujeres con lesiones pre-invasivas o invasiva por VPH, consistentemente muestran disbiosis bacteriana o microbial (Tabla 2). Se ha descrito, que la disbiosis microbiana vaginal, como lo es en la VB, podría conducir a una mayor susceptibilidad a la infección por el VPH y a su vez podría reducir la capacidad del sistema inmune (SI) para eliminar la infección (Dareng *et al.*, 2016, Gillet *et al.*, 2011). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la infección por el VPH pueda estar modificando el microambiente vaginal y esté favoreciendo el crecimiento de otras especies, hasta generar un desequilibrio de abundancia bacteriana y generar disbiosis o vaginosis bacteriana.

Las técnicas moleculares actuales, como la secuenciación masiva de DNA, han permitido caracterizar la diversidad de las poblaciones microbianas participantes tanto en disbiosis como en condiciones normales y hacer una relación con los diferentes grados de neoplasias intraepiteliales y estadios de cáncer cervicouterino, sugiriendo que la microbiota puede generar un microambiente especial. En la microbiota vaginal de mujeres saludables, se

encuentran mayormente la presencia de especies de *Lactobacillus* spp., los cuales se asocian a acción citotóxica en células tumorales cervicales y a un pH vaginal bajo (< 4.5) (Schwebke *et al.*, 1996) por la producción de ácido láctico (Boskey *et al.*, 1999 y Motevaseli *et al.*, 2013). Por el contrario, las poblaciones microbianas vaginales en disbiosis se relacionan a un pH más alto (>4.5) (Schwebke *et al.*, 1996). Así mismo, recientemente se describió la composición de la microbiota cervico-vaginal de mujeres sanas, observándose mayor densidad de *Lactobacillus* spp. y una similitud de composición de microbiota entre vagina y cérvix. Los autores de este último estudio hacen referencia a relación de la microbiota en el tracto genital femenino con algunas patologías correspondientes al sitio anatómico, es decir, la microbiota podría estar jugando un papel importante en diferentes patologías del tracto genital femenino, incluido el cérvix y vagina. A su vez es importante resaltar que la microbiota vaginal y cervical no presenta diferencias significativas poblacionalmente entre ellas (Chen *et al.*, 2017) (Figura 5).

Los estudios clínicos han demostrado que los niveles de citocinas proinflamatorias vaginales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , son más altos en las mujeres con VB (Anderson *et al.*, 2011, tres *et al.*, 2006) y que ello puede inducir inflamación crónica, factor importante para el desarrollo de la carcinogénesis en diferentes tipos de tejidos, incluido el cervical (Kemp *et al.*, 2010). La inflamación es una respuesta fisiológica relativamente inespecífica a la lesión tisular causada principalmente por factores exógenos, entre las que se encuentran las infecciones microbianas. La respuesta inflamatoria implica la migración de células inmunes, como células asesinas naturales (NK), neutrófilos y fagocitos, que liberan mediadores inflamatorios, como son las citocinas (Castle *et al.*, 2001). En el caso de tumores, existe un infiltrado inflamatorio que puede comprender una vasta población de diferentes células inmunes, cada una capaz de producir también citocinas u otros factores que pueden alterar el destino de las poblaciones inmunes dentro del tumor y señalar para el reclutamiento de otras poblaciones celulares,

principalmente de leucocitos. Los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), son los primeros tipos de células inmunitarias que se reclutan a los sitios de inflamación, seguido por los monocitos (Heitbrock *et al.*, 2007). Los neutrófilos asociados a tumores son capaces de polarizar el fenotipo de otras células inmunes y alterar la composición celular del microambiente tumoral (Houghton *et al.*, 2010), en especial los neutrófilos del estado N2, los cuales promueven el crecimiento tumoral mediante la modulación de citocinas. Una proporción significativa del infiltrado inmune en los tumores está constituida por macrófagos asociados a tumores. Se cree que los tumores de fase temprana tienen macrófagos de tipo 1, los cuales producen citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, como CXCL10 y CXCL19 para reclutar Th1, Th17 y a las células NK (Krausgruber *et al.*, 2011). Cuando existe una inflamación crónica, suele generarse una respuesta a ello, dando como resultado la producción de oxidantes antimicrobianos inespecíficos protectores, que pueden causar daño oxidativo al ADN del huésped, dando lugar a alteraciones celulares que pueden culminar en cáncer (Ames *et al.*, 1995, Castle *et al.*, 2001). En los tumores más avanzados, los macrófagos asociados a tumores se polarizan hacia un estado de tipo 2, para estimular la diferenciación de Th2 y la producción de potentes factores angiogénicos como VEGF para facilitar la remodelación del tejido y la tumorigénesis (Biswas *et al.*, 2010). Por lo que las citocinas son producto y mediadores importantes del proceso inflamatorio.

Existe evidencia que apoya por medio de diferentes parámetros de inflamación, como por ejemplo la presencia de neutrófilos en muestras de fluidos cervicovaginales en mujeres con lesiones de alto riesgo, que puede conducir a un proceso de inflamación crónica, el cual es considerado un factor de riesgo importante para el desarrollo de CaCu (Castle *et al.*, 2001). Aunado a esta evidencia, se han descrito, en lavados cervicovaginales de pacientes con CaCu, la presencia de citocinas proinflamatorias como interleucina IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL-10, TGF-  $\beta$ 1 y TNF-  $\alpha$ , mientras que los niveles de IFN- $\gamma$  se describieron sin cambios (Tjong *et al.*, 2001). Así mismo,

en pacientes con CaCu, se ha identificado la presencia de metabolitos de enzimas inmunoreguladoras; como las quinureninas, productos de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (Mittal *et al.*, 2013, Ferns Det *et al.*, 2015). Esta enzima participa en procesos inflamatorios, en la regulación de la expresión de citocinas (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-23), la activación de las células T reguladoras, inhibición de las células T y de las células NK (Mándi *et al.*, 2012).

El estudio de diversos factores que influyen en el desarrollo de la carcinogénesis se suele estudiar en modelos *in vivo* que permitan las condiciones más cercanas a la realidad. Bajo la premisa del alto porcentaje de identidad de los genomas del ratón y del ser humano, los modelos murinos experimentales, son una herramienta útil para el estudio de diversas patologías como el CaCu. Tal es el caso del modelo murino transgénico K14E7, el cual, bajo el promotor de queratina 14 (K14) expresa la oncoproteína E7 del VPH 16 y mediante un tratamiento prolongado con E<sub>2</sub>, desarrolla CaCu (Chung *et al.*, 2008, Cortés *et al.*, 2013). Dicho modelo en etapas tempranas de la carcinogénesis se relaciona con alteraciones inmunológicas, como la sobreexpresión de interleucinas Il13ra2, Il17ra, Il1r2, Il20ra, Il22ra, Il31ra, Il4ra (Munguía *et al.*, 2018) a los dos meses de edad e Il1a, Il1b, Il8rb, Il2ra (Cortés *et al.*, 2013) a los 4 meses de edad ambos con tratamiento hormonal. También se observó la sobreexpresión de la enzima inmunoreguladoraIDO en el mismo modelo a los 4 meses de edad. Sin embargo no se ha esclarecido qué efectos desencadenan dicha expresión de esta enzima y de las interleucinas descritas, las cuales están relacionadas a procesos inflamatorios y de respuesta a inflamación (Peters *et al.*, 2013, Gosmann *et al.*, 2014, Bakshi *et al.*, 2008, Dinarello *et al.*, 2012). Así mismo en el mismo modelo K14E7, nuestro grupo realizó un estudio de la diversidad de la microbiota vaginal con base a la secuenciación de 16S rDNA, concluyendo que a lo largo de la carcinogénesis existe un cambio en la abundancia de la población microbiana vaginal, caracterizada por aumento general de miembros del Filo Firmicutes, disminución del género

*Porphyromonas* (Filo Bacteroidetes), de la familia Sphingomonadaceae (Filo Proteobacteria), y aumento desde edades tempranas del género *Proteus* (Filo Proteobacteria). No obstante, se desconoce qué repercusiones tengan estos cambios de la diversidad de la microbiota o disbiosis en procesos de carcinogénesis cervical, ni su relación a procesos inflamatorios (Velázquez, 2015).

## **2. Justificación**

El CaCu es una enfermedad multifactorial, principalmente relacionada a la infección por el VPH-AR. Su iniciación, progresión y metástasis, se relaciona a alteraciones genéticas, inmunológicas y a disbiosis de la microbiota cervicovaginal. Un factor de riesgo, en mujeres infectadas por VPH-AR, parece ser la presencia de E<sub>2</sub>. Se sabe que la microbiota vaginal difiere en mujeres sanas de mujeres VPH-AR positivas, sugiriendo un papel importante en procesos relacionados a la carcinogénesis, aún no dilucidados por completo. Por otro lado, este proceso de carcinogénesis cervical se ve acompañado de alteraciones inmunológicas como son procesos inflamatorios y expresión de citocinas proinflamatorias, que son evidentes desde etapas tempranas del proceso patológico, las cuales deben explorarse más para el entendimiento de dicho proceso.

Identificar orígenes de la inflamación crónica es de gran importancia para comprender factores participantes en el desarrollo de cáncer cervicouterino. El papel de la microbiota en el microambiente cervicovaginal y su relación con procesos inflamatorios sigue siendo motivo de investigación, ya que no se conoce por completo el alcance que tenga la microbiota vaginal en procesos inflamatorios, en la regulación de la expresión de enzimas inmunoregulatoras comoIDO y su contribución al aumento de proliferación celular.

Teniendo en cuenta los cambios observados en la microbiota a lo largo de la carcinogénesis cervical en el modelo K14E7 y la expresión

diferencial de genes relacionados a procesos inflamatorios en dicho modelo, este trabajo pretende dilucidar la participación de la microbiota vaginal en la expresión de citocinas proinflamatorias y sobreexpresión de la enzima IDO, a los tres meses de edad del ratón K14E7 (dos meses de tratamiento con E<sub>2</sub>), así como también esclarecer su relación en la proliferación del epitelio cervical. Entender la relación de dichos fenómenos en etapa temprana de la carcinogénesis, contribuirá a la comprensión del desarrollo de procesos antecesores al cáncer cervical, los cuales pueden tener alta importancia clínica y científica.

### 3. Hipótesis

La microbiota vaginal participa en la inducción de la expresión de citocinas proinflamatorias y en la sobreexpresión de IDO, durante las etapas tempranas de la carcinogénesis cervical en el modelo de ratón K14E7.

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

Determinar si la microbiota vaginal participa en la inducción de la expresión de citocinas proinflamatorias y la sobreexpresión de la IDO en tejido cervicovaginal, durante las etapas tempranas de la carcinogénesis en el modelo de ratón K14E7.

#### 4.2 Objetivos específicos

Objetivo Específico 1. Caracterizar la **expresión de citocinas proinflamatorias e IDO** en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical en el modelo murino K14E7+E<sub>2</sub> sin tratamiento de antibióticos (con diversidad de microbiota vaginal sin modificar).

Objetivo Específico 2. Caracterizar la **expresión de citocinas proinflamatorias eIDO** en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical en el modelo murino K14E7+E<sub>2</sub> con tratamiento de antibióticos (con diversidad de microbiota vaginal modificada y disminuida).

Objetivo Específico 3. Caracterizar la **expresión de PCNA** en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical en el modelo murino K14E7+E<sub>2</sub> sin tratamiento de antibióticos (con diversidad de microbiota sin modificar) en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical.

Objetivo Específico 4. Caracterizar la **expresión de PCNA** en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical en el modelo murino K14E7+E<sub>2</sub> con tratamiento de antibióticos (con diversidad de microbiota vaginal modificada y disminuida) en etapas tempranas de la carcinogénesis cervical.

Objetivo Específico 5. **Caracterizar la microbiota vaginal** presente en el modelo murino K14E7+ E<sub>2</sub> sin tratamiento de antibióticos (con diversidad de microbiota sin modificar) en etapas tempranas de carcinogénesis cervical.

Objetivo Específico 6. **Caracterizar la microbiota vaginal** presente en el modelo murino K14E7+E<sub>2</sub> con tratamiento de antibióticos (con diversidad de microbiota vaginal modificada y disminuida) en etapas tempranas de carcinogénesis cervical.

## **5. Alcance**

Con base a la información citada anteriormente y a los resultados obtenidos del seguimiento de la microbiota a lo largo de la carcinogénesis, así como los datos de expresión de genes relacionados a inflamación del

ratón K14E7 tratado con E<sub>2</sub> en etapas tempranas de la carcinogénesis, se pretende realizar un estudio en ratones de la misma cepa a edades tempranas o inicios de la carcinogénesis; es decir, a los tres meses de edad, donde el ratón presenta lesiones de tipo NIC I. Se limita a evaluar la relación de la microbiota vaginal con procesos inmunoreguladores como es la detección de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, IL-23, IL-27, MCP-1, INF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF) y la medición de la expresión de la enzima IDO. También se pretende comprobar la influencia de la microbiota de dicho modelo de cáncer cervical en la proliferación. Se contempla obtención de resultados en los que la microbiota represente un factor importante en el microambiente tumoral que contribuya a procesos inflamatorios y que sea un mediador de la sobreexpresión de IDO y de la proliferación celular del epitelio cervical.

## **6. Metodología**

### **6.1 Plan de trabajo**

Se realizaron experimentos en los grupos FvB (control negativo, sin modificación de microbiota vaginal), K14E7+E<sub>2</sub> (lesiones precursoras de CaCu, sin modificación de microbiota vaginal), K14E7+E<sub>2</sub>+ATB (lesiones precursoras de CaCu, con modificación de microbiota vaginal) a los 3 meses de edad. De cada grupo de estudio, se tomaron muestras de lavados vaginales para extraer DNA bacteriano y poder realizar la genoteca mediante PCRs de punto final, usando primers Barcodes, para posteriormente llevar a cabo la secuenciación masiva. Así mismo, de cada grupo, se diseccionaron los cervix para la detección de PCNA mediante inmunohistoquímicas y para extracción de proteínas para detección de citocinas proinflamatorias (por citometría de flujo) e IDO (por WB) (Figura 6).



## 6.2 Diseño experimental y métodos

### 6.2.1 Modelo experimental animal

Se trabajó con el modelo animal murino K14E7, que es la cepa transgénica del ratón FvB (su fondo genético), la cual expresa la oncoproteína E7 del VPH16 bajo el promotor humano de queratina 14, tal como se describe previamente (Herber *et al.*, 1996). Todos los animales fueron alojados y mantenidos con las condiciones establecidas por el bioterio de la institución del Cinvestav. Los experimentos y procedimientos fueron aprobados por la Unidad de Investigación para el Comité de Cuidados de Animales de Laboratorio (UPEAL-Cinvestav, México; NOM-062-ZOO -1999), trabajando con el número de protocolo 0250-17.

### 6.2.2 Obtención de hembras FVB y K14E7

Las hembras FvB fueron otorgadas por el bioterio de dicha institución, las cuales son provenientes de cruza FvBs de macho y hembras. Mientras que las hembras K14E7 se obtuvieron de la cruce de las cepas de hembra FvB y macho K14E7. Una vez obtenidas las camadas de dichas cruza, se separaron las hembras K14E7 a los 21 días edad y se mantuvieron en crecimiento independiente a cada cepa para su posterior experimentación a la edad de 3 meses.

### 6.2.3 Tratamiento hormonal

El tratamiento hormonal se aplicó a hembras K14E7 de 30 días de edad y consistió en la implantación de pellets de liberación continua de E<sub>2</sub> (Innovative Research of America) por medio de una cirugía en la piel del dorso del animal de un diámetro de 0.5 cm-1cm para acceder al espacio subcutáneo. Se insertó el pellet de liberación continua de E<sub>2</sub> (dosis total de

0.05 mg en 60 días). Finalmente se realizó una sutura a base de ácido poliglicólico con un calibre de 4-0. La cirugía fue acompañada de anestesia (isoflurano y oxígeno) inhalada en base a el peso del ratón (25g) constante a una razón de 250ml/minuto.

#### 6.2.4 Tratamiento de ATBs de amplio espectro

Se aplicó localmente en la vagina el mix de ATBs que contiene 0.5mg de ampicilina (SIGMA, A9518-5G), neomicina (SIGMA, N1876-25G) y vancomicina (SIGMA, 861987-4X250MG) y 0.012mg de metronidazol (SIGMA, M3761-5G) en PBS 1X estéril de pH 6.2. Se aplicó en un volumen de 15µL cada 24 horas por 6 días, usando una punta estéril, sin causar ninguna lesión o alteración al órgano.

#### 6.2.5 Ciclo estral

Para la determinación de la etapa ciclo estral de las hembras K14E7 y FvB, se tomó una muestra de 5ul de lavados vaginales con PBS estéril (pH 6). Los lavados vaginales se realizaron en hembras K14E7 y FvB a la edad de 3 meses y en condiciones de esterilidad. Se tomó de manera cuidadosa al ratón de la cola y sin estresarlo se posicionó la parte posterior del animal hacia el personal a manejar, para posteriormente introducir una pequeña porción de una punta estéril de micropipeta (de 10µLI) cargada con 5ul de PBS estéril (pH 6) en la cavidad vaginal del ratón y se descargó el contenido por dos ocasiones consecutivas. Posteriormente se realizó una técnica de tinción mediante hematoxilina y eosina. Para dicha tinción se colocaron los 5ul de lavado vaginal previamente recolectado sobre una laminilla porta objetos y se dejó secar por 10 minutos a 42°C. Se realizó primeramente la tinción sobre la muestra con hematoxilina y posteriormente con eosina; lavados intermedios con agua destilada y agua corriente. Una vez teñida la

muestra se observó al microscopio para observar la morfología celular obtenida en la muestra y se determinó la etapa del ciclo estral.

#### 6.2.6 Recolección de lavados vaginales y extracción de DNA bacteriano

Una vez determinado que la hembra K14E7 y FvB se encontraban en la etapa de estro (en ciclo estral) se realizaron los lavados vaginales a la edad de 3 meses y en condiciones de esterilidad. Estos lavados consistieron en el mismo procedimiento que los lavados vaginales para el ciclo estral, teniendo como cambio que el lavado se realizó con 20ul y por 3 ocasiones, recolectando de esta manera 60ul de lavado vaginal. Dichos lavados fueron colocados en tubos de polipropileno estériles de un volumen de 1.5ml y almacenados a -20°C, para su posterior procesamiento.

La extracción de DNA bacteriano se realizó usando el kit FAVORGEN (BIOTECH CORP), siguiendo sus instrucciones de uso. La cuantificación y pureza de las muestras de extracción de DNA se analizó por medio del NanoDrop Lite Spectrophotometer de Thermo Scientific. Así mismo se verificó la presencia de DNA bacteriano por medio de un fraccionamiento electroforético en gel de agarosa al 0.5% teñido con Midori Green advanced (1:14), usando buffer de corrida (TBE), buffer de carga (1:9 de azul de bromofenol 0.25% y glicerol en agua 0.30%) y 3ul de la muestra de DNA extraído.

#### 6.2.7 Inmunohistoquímicas

El tejido cervical de las hembras FvB y K14E7 de 87 días de edad fue procesado para la realización de inmunohistoquímicas con los anticuerpos PCNA e IDO. El cérvix de dichos ratones se diseccionó y se colocó en una solución de paraformaldehído (4%) para su fijación. Posteriormente se realizó deshidratación del tejido con diferentes soluciones de alcoholes (75%, 95%,

100%) y Xilol (100%) por una hora cada uno, para enseguida embeber el tejido en parafina. Una vez que el tejido se colocaba en casete de parafina, se realizaron los cortes histológicos y se procedió a la realización de la inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica se realizó en dos etapas, la primera consistió en: la hidratación del tejido (Xilol al 100%, alcohol al 100% y alcohol al 70%), recuperación antigénica en buffer de citratos (citrate 20X, Bio SB<sup>®</sup>), bloqueo de peroxidadas endógenas (PolyDetector Peroxidase Blocker, Bio SB<sup>®</sup>), bloqueo contra antígenos inespecíficos (Leche Svelty al 5%) del tejido e incubación con su respectivo anticuerpo primario: PCNA (1:175, Santa Cruz Biotechnology) e IDO (1:200, Abcam). La segunda parte de la inmunohistoquímica consistió en la incubación con el anticuerpo secundario (Mouse/Rabbit PolyDetector, Bio SB) revelando con cromógeno (1:50, Mouse/Rabbit PolyDetector DAB HRP, Bio SB), contraste de tinción (Hematoxilina de Harris) y montaje permanente (GVA Mounting Solution, Invitrogen) del tejido en portaobjetos.

#### 6.2.8 Extracción de proteínas de tejido cervico vaginal

Se realizó la disección del tejido cervicovaginal de las hembras FvB y K14E7 de 3 meses de edad para poder realizar la extracción de proteínas posteriormente. Se pesó el tejido y se disgregó por ruptura mecánica con nitrógeno líquido. Una vez triturado el tejido, se añadió 1ml del Buffer T-PER (T-PER<sup>®</sup> Tissue protein extraction reagent) para realizar la extracción de proteínas y obtener un homogenizado. Se centrifugó la muestra a 12000xg por 15 minutos y se recolectó el sobrenadante. Finalmente, a esta porción se le agregó inhibidores de proteasas (PMSF, Ortovanadato de sodio, coctel de inhibidores de fosfatasa, Santa Cruz Biotechnology) y se almacenó la muestra a -70°C para su posterior procesamiento.

Para verificar la integridad de las proteínas obtenidas, primeramente, se cuantificaron por el método de Bradford (Quick Start Bradford Protein Assay) y posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 % usando el buffer (Tris base, glicina y SDS). La tinción de proteínas se efectuó usando azul de coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250) y se destiñó el gel con (Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution).

#### 6.2.9 Detección de citocinas

Por medio de citometría de flujo se detectó la presencia de citocinas, usando el kit LEGENDplex Mouse Inflammation Panel (Biolegend). Se usó la fracción de proteínas obtenidas anteriormente y se detectó su MFI (Intensidad Media Fluorescente), por medio de citometría de flujo.

#### 6.3.0 Western Blot para identificación deIDO

Se corrió un gel SDS-PAGE (12%) de la fracción de proteínas obtenidas de los tejidos cervico-vaginales previamente procesados. Posteriormente se realizó la transferencia semi-seca de proteínas a membrana de nitrocelulosa (0.2µm, BIO-RAD) a 20V durante 40 minutos. Se bloqueó las proteínas presentes en la membrana de nitrocelulosa con leche en polvo bajo en grasa (solución al 5% disuelta en TTBS) durante una hora. Enseguida, se incubó dicha membrana durante una hora con el anticuerpo primario anti-ratón IDO (1:200, Biolegend). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TTBS por 10 minutos cada lavado, para después incubar el anticuerpo secundario anti-Rata IgG durante una hora. Nuevamente se realizaron lavados (3) por media hora. Se reveló la membrana (Immun-star WesternC™ Kit, BIO-RAD) para la detección de la enzima IDO y después se incubó la misma membrana con actina β (donado por el departamento de

Biología celular del Cinvestav) y anti-mouse bajo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

### 6.3.1 Determinación de carga bacteriana

Se sembró la cepa mutante de *Escherichia coli* SK10019 (*pnpΔ683*) en placas de agar durante 24 horas, se tomaron colonias y se inocularon en medio líquido LB y se incubó hasta alcanzar una densidad óptica de absorbancia a 550nm. Se tomaron 100 $\mu$ L de cada dilución y se sembraron en placas de agar y se determinó después de 24 horas el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Se extrajo DNA de las diluciones seriadas usando el kit de FAVORGEN (BIOTECH CORP), siguiendo sus instrucciones de uso y se realizaron qPCR para correlacionar el ciclo de amplificación con la dilución y sus UFC mediante el método de curva de calibración.

### 6.3.2 Secuenciación masiva

Se preparó la genoteca de la región polimórfica V3 del gen rDNA 16S usando las secuencias únicas “barcode” y secuencias adaptadoras de la tecnología del secuenciador “Ion Torrent” mediante una PCR de tiempo final. Se usaron las siguientes condiciones y secuencias barcodes mencionadas en la Tablas 5 y 6.

Posteriormente se realizó el pool preparativo para la purificación de los productos por medio de un gel de agarosa al 2% (E-Gel SizeSelrct), cada muestra se encontraba a una concentración de 10ng. Enseguida, se cuantifica la banda obtenida y se toman 22pM del pool para cargar al chip de secuenciación (Ion 318™ Chip KIT BC-4 Pack).

Las lecturas obtenidas por el software Torrent suite v4.4.3 se analizan en QIIME v.1.9.0., para llevar a cabo la agrupación en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) y posteriormente se compararon con la

base de datos de Green genes. Se realizaron análisis de abundancia relativa, de diversidad alfa, diversidad beta y un análisis LEfSe.

## 7. Resultados y Discusión

Se trabajaron con ratones hembras de las cepas FvB y K14E7 de 3 meses de edad. Las hembras FvB provienen de la cruce de un macho y hembra FvB (cepa isogénica), en cambio las hembras K14E7 provienen de la cruce de macho K14E7 y hembra FvB. La secuencia de los genes E6 y E7 se encuentran bajo control del promotor del gen de queratina humana 14 (K14). E6 tiene una región de terminador de la traducción (TTL), expresándose solamente la proteína E7. Por último, se encuentran las secuencias de poliadenilación del gen K14 humana (K14PA). Las cepas de ratones trabajadas fueron valoradas genética y fenotípicamente. Por genotipo, la cepa se caracterizó por medio de la amplificación del transgen el cual tiene un tamaño aproximado de 805pb (figura 7B). El fenotipo de la cepa K14E7 y FvB es referenciado por las características citadas por Herber *et al.*, 1996. De esta manera se seleccionaron a los ratones que mostraron menor tamaño con respecto al FvB, alteraciones en el pelaje, mayor grosor de piel y cataratas en los ojos (Figura 7C-G y Tabla 3).

A estos ratones con el fenotipo transgénico, se les aplicó un tratamiento hormonal de E<sub>2</sub> durante 2 meses, el cual consiste en colocar el pellet de liberación prolongada a nivel dorsal intraepitelial (Figura 8). Dicho procedimiento fue realizado debido a que esta cepa junto a este tratamiento hormonal durante 6 meses desarrolla CaCu, convirtiendo a esta cepa en un modelo de estudio de CaCu. A lo largo de estudios del modelo de carcinogénesis cervical K14E7, se han valorado diferentes etapas de dicha patología, por lo que el principal interés de este estudio es evaluar la etapa temprana de la carcinogénesis cervical; en este trabajo se realizó a los 3 meses de edad. A esta edad se han detectado lesiones de bajo grado (NIC I

y NIC II), por lo que se puede incursionar en el estudio de mecanismos tempranos de la carcinogénesis y factores influyentes en esta primera etapa.

Para evaluar la influencia que tiene la microbiota vaginal del modelo K14E7 sobre procesos que pueden contribuir al desarrollo de la carcinogénesis cervical, se disminuyó la carga bacteriana a nivel local en vagina. Dicho proceso consistió en aplicar localmente durante 6 días un coctel de ATBs de amplio espectro, que consistió en ampicilina, neomicina, vancomicina y metronidazol diluidos en PBS. Se aplicó localmente en la vagina de los ratones K14E7 a los 81 días de edad durante 6 días, se extrajo el DNA de lavados vaginales (antes y después de la aplicación de los ATBs) y se midió su carga bacteriana por medio de qPCR, amplificando la región V3-V4 del gen ribosomal 16S. Se relacionaron los Cts promedio obtenidos con las UFC por cada dilución y se observó que los ratones K14E7+E<sub>2</sub> tiene Cts (Ciclo umbral) que corresponden a los ciclos de amplificación 21 para ratones sin ATBs y 25 para ratones con ATBs; es decir hubo un cambio de 8530 UFC/ml a 20 UFC/ml correspondiente a la curva de calibración de Cts vs UFCs (Figura 8). Lo cual corresponde a una disminución significativa ( $p=0.009$ ) de 8510 UFC/ml, por lo que de esta manera se determinó que se disminuyó significativamente la carga bacteriana en vagina a los 6 días de tratamiento con coctel de ATBs y bajo lo observado se prosiguió para evaluar los parámetros planteados en este trabajo.

Una de las características de las lesiones tempranas de CaCu es el aumento en la proliferación celular de la capa basal del epitelio cervical y su extensión a otras capas basales, debido a la interacción de oncoproteínas expresadas por el VPH con proteínas del ciclo celular y por otros mecanismos que favorecen la favorecen indirectamente. La oncoproteína E7 altera el ciclo celular, al unirse a la proteína Rb hipofosforilada. Esta última proteína ejerce una función supresora sobre el factor de transcripción E2F, al unirse y retenerlo para que no se transcriban los genes blancos a este factor de transcripción, algunos de los cuales están relacionados a proliferación celular como son las ciclinas. Ya que nuestro modelo de CaCu presenta la



expresión de la oncoproteína E7, se buscó analizar la proliferación y su relación con la presencia o ausencia de la microbiota vaginal en el ratón K14E7 dicha búsqueda se analizó por medio del marcador de proliferación PCNA (Figura 9). Los experimentos fueron realizados en la etapa de estro del ciclo estral de los ratones FvB y para los K14E7 en un estadio no definido (debido a que su ciclo estral se encuentra alterado), a la edad de 87 días. Todo ello debido a que se sabe que las hormonas pueden influir en diversos procesos fisiológicos, en el grosor de epitelio, en la expresión de genes y en cambios en el microambiente vaginal; es decir podría influir en la presencia de cierto tipo de microbiota vaginal. Por lo que se optó en hacerlo en un solo ciclo estral (estro) para reducir la influencia de la presencia de diferentes hormonas y las variables que podrían estar influyendo en los procesos a analizar. También se realizaron los estudios en estro, debido a que se trabajó el modelo de CaCu bajo la influencia de la aplicación de un tratamiento a base de estrógenos. Se encontró que los ratones FvBs a la edad de 87 días, cumplían con las diferentes etapas del ciclo estral en sus  $\approx 48$  horas de duración, mientras que los ratones K14E7 +E<sub>2</sub> mostraron alteraciones en la morfología celular recolectada de los lavados vaginales (Figura 10) a la misma edad. Se observó en los K14E7+E<sub>2</sub> la presencia de tipos celulares característicos de cada estadio estral, sin poder definirse dentro de uno de los cuatro estadios representativos del ciclo estral. La alteración observada en el ciclo estral, probablemente se deba a la acción del tratamiento a base de estrógenos.

Una vez cumpliendo la edad de procesamiento de los ratones y terminado sus respectivos tratamientos, se prosiguió a procesar el tejido cervicovaginal. Primeramente, se evaluó la expresión de PCNA en tejido cervical, por medio de inmunohistoquímicas, así como también se evaluó la histología general del tejido por medio de tinciones con hematoxilina y eosina (Figura 9). Como podemos ver en tejido cervical del ratón FvB, se observa mayor tinción con hematoxilina de manera delimitada en la capa basal del epitelio cervical, mientras que en el ratón K14E7+E<sub>2</sub>, que es el modelo de

CaCu, presenta lesiones precursoras de CaCu. Se observa tinción a lo largo de la capa basal, parabasal y suprabasal; así como invaginaciones de la capa basal hacia el estroma. La expresión de PCNA (se evaluó con n=3 por grupo) se observa en el control prácticamente limitado en la capa basal, de manera contraria observamos que en el tejido K14E7+E<sub>2</sub> se extiende la proliferación hacia la capa suprabasal y que también se encuentra presente en gran medida en las invaginaciones hacia el estroma. Sin embargo, cuando se trata al ratón K14E7+E<sub>2</sub> con el coctel ATBs (K14E7+E<sub>2</sub>+ATB), se puede observar disminución en la expresión de PCNA en comparación con el K14E7+E<sub>2</sub>; es decir, una menor proliferación celular (Figura 9), localizándose la señal en la capa basal del epitelio. Probablemente al estar modificando la microbiota del modelo de CaCu, se pueda estar modificando de igual manera la proliferación celular del tejido cervical. En congruencia con otros estudios (Reikvam *et al.*, 2011 y Smith *et al.*, 2007) donde usan el mismo coctel de antibióticos, aunque a diferentes dosis y días; observan que a nivel de epitelio intestinal hay una expresión diferencial de genes relacionados a proliferación entre los ratones sin ATBs versus los que tienen ATBs. Así mismo midieron un marcador de proliferación Ki67, en donde observaron que disminuye la presencia de dicho marcador en el epitelio, es decir, al disminuir la microbiota mediante uso de ATBs, se disminuyó la proliferación celular. Argumentando los autores, que la microbiota intestinal comensal podría estar regulando la proliferación celular, ya que también compararon la expresión de algunos genes encontrados diferencialmente expresados en los ratones con ATBs, son genes que se encuentran de manera similar en ratones libres de gérmenes. Dicha información sustenta nuestros resultados, ya que al modificar la microbiota vaginal, podemos observar disminución de la proliferación, limitándose principalmente en la capa basal como sucede en el ratón sin lesiones precursoras a CaCu o FvB. Sin embargo, no podemos descartar la probabilidad de que el efecto del antibiótico pueda tener un efecto directo o indirecto ajeno a la microbiota que pueda estar influenciando la proliferación.

Como se mencionó anteriormente el proceso de CaCu se ve acompañado de una inflamación crónica, incluso desde etapas tempranas de la carcinogénesis. Por lo que se estudió en este trabajo la influencia que puede tener la microbiota vaginal sobre procesos inflamatorios. Para ello, se enfocó el estudio en análisis de la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, IL-23, IL-27, MCP-1, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF por medio de citometría de flujo, usando un lisado de proteínas provenientes de tejido cervico-vaginal de los ratones de los diferentes grupos mencionados. Primeramente, se evaluó que la metodología usada para la extracción de proteínas contuviera la fracción correspondiente a los pesos de las citocinas a medir y que además se encontraran integras dichas proteínas. Se usaron dos buffers de extracción: Pierce RIPA (Thermo SCIENTIFIC) y T-PER Tissue (Thermo SCIENTIFIC) (figura 11). Usando ambos buffers de extracción se pudo obtener proteínas que están en el rango de tamaños de las citocinas a identificar, las cuales van desde 13.8KDa hasta 70KDa. Se observó que ambos métodos eran eficientes para la obtención de proteínas integras y en concentración deseada. Debido a ello, se optó por trabajar con el buffer de extracción T-PER. Posteriormente se realizó el ensayo de detección de citocinas proinflamatorias por medio de citometría de flujo usando el kit LGENDplex de Biolegend; se detectaron Interleucinas (Figura 12), Interferones (Figura 13), quimiocinas, el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Figura 14).

Se encontró que, las citocinas IL-23, IL-1 $\alpha$  e IL-17 aumentan en los ratones K14E7+E<sub>2</sub>, con respecto a los FvB; es decir en las lesiones precancerígenas se encuentran sobreexpresadas dichas citocinas. IL-1 $\alpha$  disminuye ligeramente en los ratones tratados con ATB, con respecto a los K14E7+E<sub>2</sub>; es decir, el tratamiento con ATB que provoca la disminución de la carga bacteriana, propicia una ligera disminución de la expresión de IL-1 $\alpha$ . Esta citocina proviene principalmente de macrófagos, pero también incluye otras fuentes celulares como, neutrófilos, queratinocitos y células

endoteliales. La producción de IL-1 $\alpha$  puede ser inducida por productos bacterianos como los Lipopolisacáridos (LPS). En este caso no observamos una disminución significativa de esta citocina, cuando se aplica el tratamiento de ATBs, pero si una ligera disminución de la MFI (Intensidad Media de Fluorescencia) que va desde 21561.33 a 18136.2 unidades. La IL-23, es una citocina proinflamatoria compuesta por dos subunidades; p19 y p40. Es expresada principalmente por macrófagos y células dendríticas (DC). Sus funciones principales se describen cuando existe estimulación de presentación de antígenos por las DC, la producción de IFN- $\gamma$  y la diferenciación de las células T a células TH17. Estas últimas células, se caracterizan por la producción de citocinas como la IL-17; la cual, predominantemente es producida por las células T activadas, fibroblastos estimulados, células endoteliales, macrófagos y células epiteliales. El eje de la vía IL-23/IL17, pueden estimular la producción de IL-1, entre otras citocinas, recluta neutrófilos al sitio de infección para ayudar a eliminar bacterias extracelulares presentes. En mujeres con disbiosis vaginal, se ha identificado esta vía alterada (Masson et al., 2015), en especial la expresión de IL-23. Cuando usamos ATB o se disminuye la carga bacteriana, la expresión de IL-23 disminuye y su MFI es similar a la del grupo FvB. Por lo que se propone el modelo citado en la figura 15. La citocina IL-12p70 disminuye en el grupo de ATB, con respecto al grupo FvB, por lo cual podríamos decir que la disminución de la carga bacteriana vaginal del modelo de carcinogénesis cervical o la modificación de la microbiota vaginal del mismo modelo mediante el uso de ATBs, tiene repercusiones sobre la expresión de la citocina IL-12p70, ya que ello se ve reflejado también en el K14E7+E<sub>2</sub>. Se ha descrito que para el aumento de esta interleucina, se necesita de la presencia de bacterias y de la molécula adaptadora TRIF (Spelmink *et al.*, 2016). Lo cual hace sentido, ya que esta citocina, se encuentra poco expresada en el grupo que tiene el tratamiento con ATBs.

La expresión de citocinas proinflamatorias puede influir en la expresión de otros genes y repercutir procesos como proliferación, angiogénesis,

invasión, inflamación, migración y apoptosis. Por lo que se optó estudiar la expresión de la enzima inmunoreguladora IDO, la cual responde a la expresión de citocinas proinflamatorias como IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Esta enzima tiene un peso aproximado de 45KDa y su sobreexpresión, se encuentra relacionada en varios tipos de cáncer y a una baja supervivencia, entre los diferentes tipos de cáncer se encuentra el CaCu. En este trabajo se evaluó la expresión de IDO, mediante la medición de su proteína por Western Blot (WB), para ello se extrajo proteína del tejido cervicovaginal de cada grupo de ratones antes mencionados (n=5 por cada grupo) (Figura 16). Se encontró una expresión diferencial de IDO entre los grupos estudiados. El tejido cervicovaginal de los ratones K14E7+E<sub>2</sub> en comparación con los ratones FvB, presentaron una sobreexpresión de IDO (p=0.0001); sin embargo, el grupo K14E7+E<sub>2</sub>+ATB, presentó una mayor expresión respecto a los FvB y los K14E7+E<sub>2</sub> sin ATB. Es decir; en los ratones control o FvB, que presentan una microbiota vaginal sana y sin modificar tienen una expresión baja de IDO, mientras que los ratones con lesiones precursoras a CaCu presentan una mayor expresión. Cuando se compara la expresión de IDO en los diferentes grupos con lesiones precursoras a CaCu, se observa una mayor expresión en el grupo con tratamiento de ATBs; es decir, existe una mayor expresión de IDO en el grupo que se disminuye la carga bacteriana (p=0.2002). Este resultado muestra que al disminuir la microbiota con ATBs, la expresión de la proteína IDO se ve modificada, lo cual podría estar sugiriendo que la microbiota vaginal puede jugar un papel importante en la regulación de la enzima.

Congruente con la sobreexpresión de IDO en pacientes con diferentes tipos de cáncer, se observó lo mismo en este modelo de estudio de CaCu; sobreexpresión en los ratones con lesiones precursoras versus el control sin lesiones. Lo cual quiere decir que puede existir un ambiente inmunosupresor desde etapas tempranas de CaCu, al encontrarse sobreexpresada la enzima IDO; y que esta pueda estar metabolizando Trp a quinureninas, que a su vez puedan regular negativamente la proliferación de las células T, activar las

células T reguladoras y favorecer la expresión de IFN- $\gamma$ , que a su vez favorecerá la expresión de la mismaIDO. En general creando un microambiente favorecedor del proceso de CaCu. Como se pudo observar, en este trabajo se encontró un ligero aumento deIDO en el grupo con tratamiento de ATBs o con microbiota modificada; a su vez en este grupo, presentó un aumento significativo de IFN- $\gamma$ . Por lo que se podría explicar el aumento de la expresión deIDO en este grupo.

En cuanto al resultado con ATBs eIDO, el aumento observado, podría estar relacionado con lo descrito a nivel de epitelio intestinal por Zelante *et al.*, 2013 y Vujkovic *et al.*, 2015. Ellos observaron una correlación entre la ausencia o disminución de especies del género *Lactobacilos*, con la sobreexpresión de la enzimaIDO. Es decir; cuando existía una baja densidad de especies *Lactobacilos* la expresión deIDO era mayor. Esta relación podría estar dada por el Trp, que es el sustrato de la enzimaIDO y uno de los componentes de la dieta microbiana (específicamente en *Lactobacilos*). Se ha descrito que, el Trp al estar biodisponible en el microambiente epitelial intestinal, puede ser metabolizado por *Lactobacilos* a indol-3-aldehído, así como también es el caso de que, cuando hay alta expresión deIDO, hay menor biodisponibilidad de Trp. Por lo que, en base a nuestros resultados, se plantea que al modificar la microbiota vaginal, es decir; al disminuir la carga bacteriana, hay menos bacterias que puedan metabolizar el Trp, encontrándose probablemente en mayor proporción, por lo que hay mayor biodisponibilidad para el metabolismo de la enzimaIDO y de esta manera estarse favoreciendo su expresión. La sobreexpresión que vemos enIDO puede ser debido a la abundancia de Trp, y que esto a su vez esté favoreciendo un ambiente de diferente que propicie la adaptación microbiana a diferentes especies en comparación con los FvBs y los K14E7+E<sub>2</sub>. Por lo que proponemos que microbiota puede estar regulando la expresión deIDO por medio de la biodisponibilidad del Trp.

Con la finalidad de relacionar qué tipo de microbiota vaginal puede estar influenciando la expresión de citocinas proinflamatorias eIDO en el

tejido cervicovaginal se caracterizó la microbiota vaginal de cada grupo (n=5) de este estudio. Para el análisis de microbiota vaginal, se tomaron lavados vaginales de cada ratón usando PBS (pH 6.4) estéril. Los lavados fueron tomados en los FvB en el estadio de estro, mientras que para los ratones K14E7+E<sub>2</sub> y K14E7+E<sub>2</sub>+ATB se tomaron las muestras en un ciclo estral no identificado, ello debido a que su ciclo estral se encuentra alterado, mostrando una mezcla de morfología celular de las diferentes etapas del estadio estral. De cada muestra se extrajo el DNA por separado y se cuantificó (tabla 4). Posteriormente para comprobar que el DNA extraído de los lavados vaginales era DNA de origen bacteriano y que se encontraba en condiciones óptimas para amplificar el gen ribosomal 16S, se realizaron PCRs de punto final de las muestras provenientes de ratones FvB y K14E7+E<sub>2</sub> (figura 17b). Se usaron los primers CGO 465, que amplifican la región V3 y V4 del gen ribosomal 16S (figura 17a). Como podemos observar ambos tipos de muestras fueron capaces de amplificar, por lo que parte del DNA obtenido muestra ser de origen bacteriano, muestra integridad y se encuentra en condiciones óptimas para amplificar la región V3-V4 del 16S rDNA.

Una vez comprobado que la muestra de lavado vaginal puede amplificar la región V3 del 16S rDNA, se realizó la construcción de las genotecas para secuenciación. Para ello, se amplificó dicha región polimórfica V3 usando primers barcodes: los cuales contienen una secuencia única de nucleótidos "GOLAY BARCODE", una región adaptadora "ION TORRENT LINKER", una secuencia de dos bases "SPACER" y la secuencia correspondiente al "PRIMER F o R". Se comprobó las ampliaciones de cada una de las PCRs barcodes previamente a la realización del pool de secuenciación (Figura 18). Posteriormente se realizó la purificación de los productos de PCRs y la secuenciación masiva en el equipo PGM ION TORRENT. Las lecturas obtenidas por el software Torrent suite v4.4.3 estuvieron entre un rango de 12,164 y 165,803 con un tamaño promedio de 160 pb. Dichas lecturas obtenidas en formato FASTQ les fue aplicada la

prueba de calidad donde se observó la longitud de confianza de números de bases. Consecuentemente se analizaron las lecturas en QIIME v.1.9.0., para llevar a cabo la agrupación en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) representativos y compararlos con la base de datos de Green genes. Se obtuvieron los datos abundancia relativa de las muestras estudiadas de manera individual y por grupo (figura 19).

Se obtuvo que en el grupo FvB el Filo más abundante es Proteobacteria con 62.8%, así mismo en el grupo K14E7+E<sub>2</sub> con 42.15% y K14E7+E<sub>2</sub>+ATB con 47.73%. Contrariamente, el Filo que se encuentra en menor abundancia relativa es Cyanobacteria en los grupos: FvB con 2.16%, en K14E7+E<sub>2</sub> con 0.67% y en K14E7+E<sub>2</sub>+ATB con 2.82% (figura 19 A). Comparando la microbiota vaginal a nivel de Filo de los grupos de ratones sin lesiones o FvBs contra los ratones con lesiones precursoras de CaCu o K14E7+E<sub>2</sub>, encontramos que hay una diferencia significativa  $p=0.003$ . Sin embargo, cuando se comprara la microbiota vaginal de los grupos sin lesiones con los grupos con lesiones con el tratamiento de ATBs, no se encontró diferencia significativa ( $p=0.38$ ). Es decir, los ratones a los que se les modificó la microbiota vaginal por medio de tratamiento con ATBs no presentan diferencias significativas a nivel de Filo por grupo con los ratones FvB, evidentemente, se observa una similitud de abundancia relativa entre sus Filo. Ejemplo de ello, es el Filo Cyanobacteria, el cual se encuentra en el grupo FvB al 2.16% y en grupo K14E7+E<sub>2</sub>+ATB 2 al 2.82%. Otro ejemplo es el Filo de Bacteroidetes el cual se encuentra en el grupo FvB al 1.51% y en el grupo K14E7+E<sub>2</sub>+ATB al 1.78%. Sin embargo, el grupo de ratones con tratamiento de ATBs presenta una mayor diversidad de especies en abundancia relativa; el grupo FvB tiene una proporción 0.88% de especies con abundancia menor al 3%, en cambio los K14E7+E<sub>2</sub>+ATB tienen 3.24% de especies con abundancia menor al 3%. Es decir, los K14E7+E<sub>2</sub>+ATB tienen más tipos de especies diferentes presentes en dicha muestra (2.36%). Cabe mencionar que se habla de abundancia relativa y que el grupo de ATBs cuenta con menor densidad de bacterias, pero dentro de ese número bajo de



bacterias existe una mayor diversidad de especies en cuanto a la abundancia relativa. Otro cambio observado, es respecto al Filo Proteobacteria, que disminuye 20.65% de abundancia relativa en ratones K14E7+E<sub>2</sub>, es decir en ratones con lesiones precursoras a CaCu comparados con los ratones FvB (p=0.79). Otro Filo que disminuye es Cyanobacteria en los mismos grupos, se observa que baja de 2.16% a 0.67%. En cambio, observamos un aumento para el Filo Firmicutes que va de los FvB del 20.60% al 46.98% en los K14E7+E<sub>2</sub> (p=0.082). También aumenta el Filo Bacteroidetes de 1.51% a 4.04% del grupo K14E7+E<sub>2</sub> a el grupo FvB respectivamente (p=0.63). Todo esto nos muestra que existen cambios a nivel de Filo de la microbiota vaginal en los modelos con lesiones y sin lesiones precursoras a CaCu.

Se analizó también la abundancia relativa de cada uno de los grupos estudiados a nivel de orden, familia y género (figura 19 B); se encontró que existen algunas diferencias significativas entre cada uno de los grupos. En el grupo de ratones con lesiones precursoras a CaCu a diferencia de los ratones sin lesiones precursoras a CaCu, se observó que especies pertenecientes al género *Actinobacillus* y de la familia Pasteurellaceae que disminuyen de manera significativa en ratones con lesiones precursoras a CaCu. De manera contraria, especies de la familia Enterobacteriaceae y Gemellaceae aumentan significativamente en los mismos ratones. Sin embargo cuando se trata a los ratones K14E7+E<sub>2</sub> con ATBs, no se observa ningún cambio significativo en dichas familias o géneros; es decir cuando se compara los grupos de microorganismos mencionados en los ratones sin lesiones con los ratones con lesiones precursoras a CaCu después del tratamiento de ATBs, ya no se encuentra diferencia significativa, por lo que observamos que después del tratamiento con ATBs hay similitud en abundancia relativa en especies del género *Actinobacillus* y de las familias Pasteurellaceae, Enterobacteriaceae y Gemellaceae.

Sin embargo, cuando se compara los grupos sin lesiones precursoras a CaCu, osea el grupo control contra el grupo K14E7+E<sub>2</sub>+ATB, no se encuentra una microbiota similar, ya que se observa que los grupos del

orden Rhizobiales, de la familia Sphingomonadaceae y Enterococcaceae, de los géneros *Bradyrhizobium* y *Methylobacterium* difieren de manera significativa.

Para observar la diversidad entre muestras y entre grupos, se realizaron dos análisis; diversidad alfa y diversidad beta (Figura 20). La primera muestra la riqueza en especies de un sitio o comunidad particular, o de un estrato dado o grupo de organismos de una posición. Mientras que la segunda, muestra la magnitud del cambio en la composición de las comunidades o el grado de diferenciación entre comunidades, en relación con un gradiente ambiental o patrones ambientales. Los resultados estadísticos indican que, la diversidad alfa entre los grupos K14E7+E<sub>2</sub>+ATB y FvB es significativa, con una  $p=0.46$  para todos los índices; siendo el grupo K14E7+E<sub>2</sub>+ATB con mayor diversidad en taxas. Sin embargo, cuando se comparan los demás grupos no se observaron diferencias, mostrando para la comparación de los grupos FvB y K14E7+E<sub>2</sub> los siguientes índices: observada: 0.429; Chao: 0.420; Shannon: 0.662; Simpson: 1. Comparando los grupos K14E7+E<sub>2</sub> con los grupos K14E7+E<sub>2</sub>+ATB, se obtuvo una  $p=0.053$  para todos los índices. En cuanto al análisis de beta diversidad no se observó alguna agrupación de las muestras por grupo (Figura 20), resultado debido probablemente a la variabilidad entre ratones.

Posteriormente se realizó un análisis LEfSe (Linear discriminant analysis effect size) para identificar los taxones significativamente abundantes en los diferentes grupos estudiados (Figura 21). LEfSe es un método que permite hacer comparaciones de alta dimensión con un enfoque particular en análisis metagenómicos. Determina las características (organismos, clados, unidades taxonómicas operativas, genes o funciones) con mayor probabilidad de explicar las diferencias entre clases mediante el acoplamiento de pruebas estándar de significación estadística (Segata *et al.*, 2011). Es decir; este estudio nos permite ver las especies presentes significativamente en un grupo en comparación con otro. Al comparar los grupos FvB y K14E7+E<sub>2</sub>, se encontró que especies de la familia Gemellacea

y del género *Roseburia* se encuentran en significativamente presentes en el grupo K14E7+E2. Posiblemente estas bacterias gran positivas anaeróbicas podrían estar relacionadas al proceso y progreso de la carcinogénesis cervical. Las bacterias con metabolismo anaeróbico suelen aumentar su abundancia en VB, y como lo hemos mencionado anteriormente la VB podría representar un factor de riesgo para el desarrollo de CaCu, así como también lo mencionan para la infección por el VIH (Hongwei *et al.*, 2018). La familia Gemellacea pertenece al Filo Firmicutes, a la clase *Bacilli*, al orden Gemellales y al género *Gemella*, se caracterizan por crecer en condiciones de alta presión parcial de CO<sub>2</sub>, pueden producir ácido acético y ácido láctico. La presencia de *Gemella* junto con otras especies en vagina, se ha descrito presentes en mujeres con VB (Lennard *et al.*, 2017, Nelson, *et al.*, 2018, Mc Clelland *et al.*, 2018). La mayoría de los estudios que describen a *Gemella* presente en situación de VB, observan su relación con el riesgo de infección por VIH, sin embargo, también podría estar ligada a favorecer la susceptibilidad por infecciones de VPH, ya que forman parte de las bacterias descritas en VB, y esta última puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de CaCu.

*Roseburia*, pertenece al Filo Firmicutes, a la clase Clostridia, al orden Clostridiales y a la familia Lachnospiraceae. Forma parte de bacterias comensales que producen ácidos grasos de cadena corta, especialmente butirato, que afectan la motilidad colónica, el mantenimiento de la inmunidad y las propiedades antiinflamatorias en intestino (Tamanai-Shacoori *et al.*, 2017). Se ha descrito que la VB se caracteriza por un decremento de especies de *Lactobacillus* y aumento de especies como bacterias del orden Clostridiales. Esta combinación de abundancias se asocia con un mayor riesgo de infección por VPH (Fredricks *et al.*, 2005). Así mismo se ha descrito que especies de la familia Lachnospiraceae forman parte de la microbiota vaginal con lesiones de bajo grado de CaCu en una población de mujeres en China (Vriend *et al.*, 2015). Congruente con ello Chandrika y colaboradores en el 2016, encontraron que bacterias del orden Clostridiales se encuentran

significativamente (mediante análisis LEfSe) presentes en vagina en mujeres con NIC I; es decir, en mujeres con bajo grado de lesiones, al igual que lo representa nuestro modelo de estudio K14E7 a los 3 meses de edad. También se ha señalado que aumenta la proporción de Lachnospiraceae en mujeres VPH+ en comparación de las mujeres VPH-, y que mujeres VPH+ que cuentan con NIC tienen mayor abundancia de estas bacterias.

## **8. Conclusión**

La microbiota vaginal recientemente se ha considerado ser un factor de riesgo para el desarrollo de CaCu. Se ha relacionado la presencia de ciertos tipos de bacterias con diferentes grados de lesiones, pero no se ha esclarecido la importancia que pueda tener para el desarrollo del CaCu. En este proyecto se evaluó la influencia que ésta puede tener sobre la expresión de citocinas proinflamatorias, la enzima IDO y PCNA, al modificarla usando un coctel de ATBs. Se logró modificar de manera significativa la microbiota vaginal, disminuyendo de manera importante la carga bacteriana. Concluyendo en base a los resultados, que la microbiota vaginal es diferente en ratones sanos y aquellos que presentan lesiones precursoras a CaCu; así como también difiere la microbiota vaginal cuando se aplica el tratamiento de ATBs a nivel local. Esta microbiota característica de lesiones precursoras puede estar involucrada en procesos relacionados a proliferación celular a nivel tejido cervical, ya que al modificarla se disminuye la señal del marcador de proliferación PCNA en la capa basal.

La expresión de la enzima IDO y de las IL-23, IL-1 $\alpha$  e IL-17 podrían estar relacionadas a la presencia del tipo de microbiota vaginal, cambiando su expresión cuando se modifica dicha microbiota con el tratamiento de ATBs. Sin embargo, no se ha esclarecido si el aumento de expresión proviene de la acción de disminuir la carga bacteriana o por la influencia de los ATBs.

## 9. Perspectivas

Al saber que la microbiota vaginal tiene influencia sobre la expresión de las citocinas IL-23, IL-1 $\alpha$  e IL-17 y sobre la expresión de la enzima IDO. Sería interesante medir la actividad de la enzima IDO, por medio la detección de su metabolito “quinureninas”, para saber si los cambios de abundancias en las poblaciones microbianas y la expresión de IDO pueden tener relación con la actividad enzimática de IDO y la biodisponibilidad del Trp. De esta manera se podría correlacionar la actividad de la enzima IDO con la biodisponibilidad de Trp y la microbiota vaginal. Asimismo, se plantea realizar la confirmación de la expresión de las citocinas detectadas al modificar la microbiota vaginal (IL-23, IL-1 $\alpha$  e IL-17) por otra técnica molecular y verificar la vía de señalización de las citocinas IL-23/IL-17.

Sabiendo que la pérdida del control de la proliferación celular, es uno de los principales rasgos del cáncer, se plantea también como perspectiva de este proyecto medir proliferación en tejido cervical usando otros marcadores de proliferación, además del usado en este proyecto (PCNA). Ki67 puede ser uno de los marcadores propuestos y sería interesante detectar su expresión por medio de otras técnicas como Western Blot.

## 10. Bibliografía

- Ames B. N., Gold L. S., Willett W. C. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl.* 1995 Jun 6; 92(12): 5258–5265.
- Anderson B, Cu-Uvin S, Raker C, Fitzsimmons C, Hillier S. Subtle perturbations of genital microflora alter mucosal immunity among low-risk pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011 May; 90(5):510-5.
- Arbeit J, Howley P, Hanahan D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Apr 2; 93(7): 2930–2935.
- Audirac A, Torres K, Bahena M, Téllez J, Martínez J, Cortina B, López G, Delgado K, Burguete AI, Cantú D, García A, Madrid V. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS One.* 2016 Apr 26; 11(4):e0153274.
- Bagchi S, Raychaudhuri P, Nevins JR. Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A transactivation. *Cell.* 1990 Aug 24; 62(4):659-69.
- Bakshi S, Zhang X, Godoy-Tundidor S, Cheng RY, Sartor MA, Medvedovic M, Ho SM. Transcriptome analyses in normal prostate epithelial cells exposed to low-dose cadmium: oncogenic and immunomodulations involving the action of tumor necrosis factor. *Environ Health Perspect.* 2008 Jun; 116(6):769-76.
- Biswas K, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010 Oct; 11(10):889-96.
- Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2010 Nov; 31(11):1905-12.
- Boskey E, Telsch K, Whaley K, Moench T, Cone R. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal High-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women 135 acidification. *Infection and Immunity* 1999; 67: 5170– 5175.
- Bravo I, de Sanjose S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends in Microbiology* 2010; 18(10): 432–438.
- Brown C, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F, Malinowski DP. Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. *J Oncol.* 2012; 2012: 289315.
- Castle E, Hillier S, Rabe L, Hildesheim A, Herrero R, Bratti M, Sherman M, Burk R, Rodriguez A, Alfaro M, Hutchinson M, Morales J, Schiffman M. An Association of Cervical Inflammation with High-Grade Cervical Neoplasia in Women Infected with Oncogenic Human Papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Oct; 10(10):1021-7.
- Castle E, Sideri M, Jeronimo J, Solomon D, Schiffman M. Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 Oct; 197(4):356.e1-6.
- Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, Li F, Yu X, Feng Q, Wang Z, Xie H, Chen X, Zeng C, Wen B, Zeng L, Du H, Tang H, Xu C, Xia Y, Xia H, Yang H, Wang J, Wang J, Madsen L, Brix S, Kristiansen K, Xu X, Li J, Wu R, Jia H. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun.* 2017 Oct 17; 8(1): 875.
- Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Molecular Cell* 2000; 5(3):557-567.
- Chung H, Franceschi S, Lambert P. Estrogen and ER $\alpha$ : Culprits in Cervical Cancer?. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 Aug; 21(8): 504–511.
- Chung H, Shin K, Korach S, Lambert F. Requirement for Stromal Estrogen Receptor Alpha in Cervical Neoplasia. *Horm Cancer.* 2014 Feb; 4(1): 50–59.

- Chung H, Wiedmeyer K, Shai A, Korach KS, Lambert PF. Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Res.* 2008 Dec 1; 68(23): 9928-34.
- Cortés M, Bonilla D, Díaz C, Hidalgo M, Romero C, Üren A, Çelik H, McCormick M, Munguía Moreno, Ibarra S, Escobar H, Lambert P, Mendoza V, Bermudez Cruz, Patricio G. Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue. *Virology.* 2013 Dec; 447(0): 155–165.
- Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2013. 382: 889-899.
- Dareng EO, Ma B, Famooto AO, Akarolo-Anthony SN, Offiong RA, Olaniyan O, Dakum PS, Wheeler CM, Fadrosch D, Yang H, Gajer P, Brotman RM, Ravel J, Adebamowo CA. Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women. *Epidemiol Infect.* 2016 Jan; 144(1):123-37.
- DeMasi J, Huh KW, Nakatani Y, Münger K, Howley PM. Bovine papillomavirus E7 transformation function correlates with cellular p60 protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 9; 102(32): 11486-91.
- Dinarello C, Simon A, Van der Meer J. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Aug; 11(8): 633–652.
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol.* 2015 Mar; 25 Suppl 1:2-23.
- Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989 Feb 17; 243(4893):934-7.
- Ferns D, Kema I, Buist M, Nijman H, Kenter G, Jordanova E. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolic activity is detrimental for cervical cancer patient survival. *Oncoimmunology.* 2015 Feb 5; 4(2): e981457.
- Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1899–911.
- Gariglio P, Gutiérrez J, Cortés E, Vázquez J. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Archives of Medical Research* 2009; 40(6): 449–465.
- Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, Broeck DV. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* 2011; 11: 10.
- Gosmann C, Mattarollo SR, Bridge JA, Frazer IH, Blumenthal A. IL-17 suppresses immune effector functions in human papillomavirus-associated epithelial hyperplasia. *J Immunol.* 2014; 193: 2248–5711.
- Hawley P, Vousden K, Hubbert N, Lowy D, Schiller J. HPV16 E6 and E7 protein cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 1989 Dec 1; 8(12): 3905–3910.
- Hedges S, Barrientes F, Desmond RA, Schwebke JR. Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora. *J Infect Dis.* 2006; 193(4):556–562.
- Heitbrock Z. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007 Mar; 81(3):584-92.
- Herber R, Liem A, Pitot H, Lambert PF. Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Virol.* 1996 Mar; 70(3): 1873-81.
- Hongwei Zhang, Jiaqi Lu, Yingying Lu, Qingqing Cai, Haiou Liu and Congjian Xu. Cervical microbiome is altered in cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure in China. *Sci Rep.* 2018; 8: 4923.
- Houghton A. The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell Cycle.* 2010 May; 9(9):1732-7. Epub 2010 May 25.
- Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J, Harper JW, Mungler K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol.* 2007 Sep; 81(18):9737-47.

- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13, 4918–4927.
- Kemp T, Hildesheim A, García P, Williams M, Shearer G, Rodriguez A, Schiffman M, Burk R, Freer E, Bonilla J, Herrero R, Pinto A. Elevated Systemic Levels of Inflammatory Cytokines in Older Women with Persistent Cervical HPV Infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Aug; 19(8): 1954–1959.
- Klebanoff M., Schwebke J., Zhang J., Nansel T, Yu K. and Andrews, W. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.* 2004. 104, 267.
- Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and T H1-TH17 responses *Nat Immunol.* 2011 Mar; 12(3):231-8.
- Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki AB Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer?. *Transl Res.* 2017 Jan;179:168-182.
- Łaniewski P1, Barnes D2,3, Goulder A1, Cui H4, Roe DJ4, Chase DM2,3,4,5,6, Herbst-Kralovetz MM. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women. *Sci Rep.* 2018 May 15; 8(1):7593.
- Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J.* 1992 Aug; 11(8):3045-52.
- LIU Z, WANG H, ZHANG X, XU Q. Primary malignant melanoma of the cervix: A case report. *Oncol Lett.* 2014 Dec; 8(6): 2661–2663.
- Livengood CH. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Rev Obstet Gynecol.* 2009; 2:28–37.
- Lennard katie, Smritee Dabee, Shaun L Barnabas, Enock Havyarimana, Anna Blakney, Shameem Z Jaumdally, Gerrit Botha, Nonhlanhla N. Mkhize, Linda-Gail Bekker, David A Lewis, Glenda Gray, Nicola Mulder, Jo-Ann S Passmore, Heather B Jaspán. Microbial composition predicts genital tract inflammation and persistent bacterial vaginosis in adolescent South African women. *Infect. Immun* 16 October 2017
- Malagón C, Bonilla D, Díaz C, Hidalgo M, Romero C, Üren, A, Çelik H, McCormick M, Munguía M, Ibarra S, Escobar H, Lambert P, Mendoza V, Bermudez C, Gariglio P. Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue. *Virology.* 2013 Dec; 447(0): 155–165.
- Mándi Y, Vécsei L. The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm.* 2012; 119(2): 197-209.
- Masson L, Salkinder AL, Olivier AJ, McKinnon LR, Gamielien H, Mlisana K, Scriba TJ, Lewis DA, Little F, Jaspán HB, Ronacher K, Denny L, Abdool Karim SS, Passmore JA. Relationship between female genital tract infections, mucosal interleukin-17 production and local T helper type 17 cells. *Immunology.* 2015 Dec; 146(4):557-67.
- Meng G, Zhao Y, Nag A, Zeng M, Dimri G, Gao Q, Wazer DE, Kumar R, Band H, Band V. Human ADA3 binds to estrogen receptor (ER) and functions as a coactivator for ER-mediated transactivation. *J Biol Chem.* 2004; 279:54230.
- Mittal D, Kassianos AJ, Tran LS, Bergot AS, Gosmann C, Hofmann J, Blumenthal A, Leggatt GR, Frazer IH. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity contributes to local immune suppression in the skin expressing human papillomavirus oncoprotein e7. *J Invest Dermatol.* 2013 Dec; 133(12): 2686-94.
- Mitra A, MacIntyre D, Lee S, Smith A, Marchesi R, Lehne B Bhatia R, Lyons D, Paraskevaidis E, Li V, Holmes E, Nicholson K, Bennett R, Kyrgiou M. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep.* 2015; 5: 16865.
- Mitra A, MacIntyre D, Marchesi R, Lee Y, Bennett R, Kyrgiou M. The vaginal microbiota human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next?. *Microbiome.* 2016; 4: 58



- Motevaseli E, Shirzad M, Akrami SM, Mousavi AS, Mirsalehian A, Modarressi MH. Normal and tumor cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. *J Med Microbiol*. 2013 Jul; 62(Pt 7):1065-72.
- Münger K, Phelps W, Bubb V, Howley P, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 1989 Oct; 63(10): 4417–4421.
- Munguía A, Díaz J, García E, Albino ME, Mendoza D, Ocadiz R, Bonilla J, Marín A, Cortés EM, Alvarez E, Hidalgo A, Üren A, Çelik H, Lambert PF, Gariglio P. Early synergistic interactions between the HPV16-E7 oncoprotein and 17 $\beta$ -oestradiol for repressing the expression of Granzyme B in a cervical cancer model. *Int J Oncol*. 2018 Aug; 53(2):579-591.
- Oh HY, Kim BS, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Park SY, et al. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(7):674.
- Phelps WC, Yee CL, Munger K, et al (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*, 53, 539-47.
- Piccini A, Storey A, Romanos M, Banks L. Human ADA3 binds to estrogen receptor (ER) and functions as a coactivator for ER-mediated transactivation. *J Gen Virol*. 1997 Aug;78 (Pt 8): 1963-70.
- Peters V, Joesting J, Freund G. IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain Behav Immun*. 2013 Aug; 32: 1–8.
- Quarmany V., Fox D, Korach C. Estrogen action in the mouse uterus: the influence of the neuroendocrine-adrenal axis. *Endocrinology*. 1984 Jan; 114(1):108-15.
- Richart R. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin. Obstet. Gynecol* 1968; 5, 748-784.
- Scheffner M., Nuber U. & Huibregtse J. M. Protein ubiquitination involving an E1–E2–E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 1995: 373, 81–83.
- Schiller J, Lowy D. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nature Reviews. Microbiology* 2012; 10(10): 681–692.
- Schwebke J, Hillier S, Sobel J. Validity of the vaginal gram stain for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 1996; 88(4 Pt 1):573–6.
- Sellers W. la colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intra epitelial cervical. Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, 2003.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*. 2016; 164(3): 337–340.
- Spelmink L, Sender V, Hentrich K, Kuri T, Plant L, Henriques-Normark B. Toll-Like Receptor 3/TRIF-Dependent IL-12p70 Secretion Mediated by Streptococcus pneumoniae RNA and Its Priming by Influenza A Virus Coinfection in Human Dendritic Cells. *MBio*. 2016 Mar 8; 7(2): e00168-16.
- Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, Loreal O, Meuric V, Fong SB, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Roseburia spp.: a marker of health?. *Future Microbiol*. 2017 Feb; 12:157-170. doi: 10.2217/fmb-2016-0130.
- Tjong M, van der Vange N, ter Schegget JS, Burger MP, ten Kate FW, Out TA. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine*. 2001 Jun 21; 14(6):357-60.
- Velázquez M. (2015). Estudio metagenómico de la microbiota del tracto reproductivo durante el desarrollo de cáncer cervicouterino (tesis de maestría). Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Politécnico Nacional, México).
- Vriend HJ, Bogaards JA, van Bergen JE, Brink AA, van den Broek IV, Hoebe CJ, et al. Incidence and persistence of carcinogenic genital human papillomavirus infections in young women with or without Chlamydia trachomatis co-infection. *Cancer Med*. 2015 July 21
- Vossen MG<sup>1</sup>, Gattringer KB, Khalifeh N, Koreny M, Spertini V, Mallouhi A, Willeit M, Volc-Platzer B, Asboth F, Graninger W, Thalhammer F, Lagler H. Gemella morbillorum

- bacteremia after anti-tumor necrosis factor alpha as acne inversa therapy. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar; 50(3): 1109-12.
- Zhang B, Chen W, Roman A. The E7 proteins of low and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 10; 103(2): 437-42.
- Zhang B, Laribee RN, Klemsz MJ, Roman A.* Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes. *Virology.* 2004 Nov 10; 329(1):189-98.

## 11. Apéndice de tablas

Tabla 1. Relación de términos de citologías cervicales		
Término de displasia	Término de acuerdo aNIC	Término de acuerdo a Bethesda
Normales	Normales	Dentro de los límites normales Cambios celulares benignos (infección o reparación) ASCUS/AGUS
Atipia	Atipia coilocítica, condiloma plano, sin cambios epiteliales	L-LIE
Displasia o discariosis leve	NIC 1	L-LIE
Displasia o discariosis moderada	NIC 2	H-LIE
Displasia o discariosis grave	NIC 3	H-LIE
Carcinoma in situ	NIC 3	H-LIE
Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

L-LIE: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; (H-LIE): lesión escamosa intraepitelial de alto grado; ASCUS: Células escamosas atípicas de significado incierto; AGUS: Células glandulares atípicas de significado incierto (Tomada y modificada de Sellors W *et al.*, 2003).

Tabla 2. Poblaciones microbianas abundantes en disbiosis vaginal		
Especie, género o filo	Población	Referencia
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Africanas	Pépin <i>et al.</i> , 2011
<i>Atopobium vaginae</i>	Asiáticas y Africanas	Brotman <i>et al.</i> , 2014. Oh <i>et al.</i> , 2015
<i>Prevotella spp</i>	Norte Americanas y Asiáticas	Klebanoff <i>et al.</i> 2004, Oh <i>et al.</i> , 2015
Fusobacteria	Asiáticas, caucásicas, Africanas, Norte americanas.	Mitra <i>et al.</i> , 2015, Lee <i>et al.</i> 2013, Audirac <i>et al.</i> , 2016
<i>Sneathia spp.</i>	Asiáticas, caucásicas, Africanas	Mitra <i>et al.</i> , 2015, Lee <i>et al.</i> 2013 Spear <i>et al.</i> , 2008
Spp: especie		

**Tabla 3 Características fenotípicas y parámetros visuales de las cepas K14E7 y FvB. Parámetros visuales para selección de fenotipo**

Cepa	Apariencia general	Tamaño corporal	Cataratas	Piel
FvB	Abundancia de pelo y sin problemas de piel.	Mayor	Ausencia	Lisa y delgada
K14E7	Zonas con ausencia de pelo y problemas de piel	Menor	Presencia	Rugosa y gruesa

Cepa FvB: control negativo; Cepa K14E7: modelo de carcinogénesis

**Tabla 4 Concentraciones de DNA provenientes de lavados vaginales**

Muestra de ratón 3 o 2 1/2 meses de edad	Concentración (ng/ul)
FvB	3.4
FvB	2.2
FvB	1.9
FvB	0.7
FvB	10
FvB	1.4
K14E7 + E <sub>2</sub>	0
K14E7 + E <sub>2</sub>	0.4
K14E7 + E <sub>2</sub>	193.2
K14E7 + E <sub>2</sub>	15.7
K14E7 + E <sub>2</sub>	105.3
K14E7 + E <sub>2</sub>	1
K14E7 + E <sub>2</sub> +ATB	3.7
K14E7 + E <sub>2</sub> +ATB	0.4
K14E7 + E <sub>2</sub> +ATB	0.8
K14E7 + E <sub>2</sub> +ATB	2.3

FvB: control negativo; K14E7: modelo de carcinogénesis; K14E7+ATB: modelo de carcinogénesis con tratamiento de Antibióticos.

Tabla 5. Secuencias barcodes utilizados para la construcción de la genoteca para la secuenciación de la región polimórfica V3 del gen rDNA 16S				
Primer	Ion torrent linker	Golay barcode	espaciador	16S rRNA Primer (5'-3')
V3-341 F1	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCaCu GACTCAG	GATCTGCGAT CCC	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F2	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	CAGCTCATCA GC	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F3	CCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCCG ACTCAG	CAAACAACAG CT	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F4	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	GCAACACCAT CC	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F5	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	GCGATATATC GC	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F6	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	CGAGCAATCC TA	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F7	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	AGTCGTGCAC AT	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F8	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	GTATCTGCGC GT	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F9	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	CGAGGGAAG TC	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F10	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	CAAATTCGGG AT	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F11	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	AGATTGACCA AC	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F12	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	AGTTACGAGC TA	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F13	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	GCATATGCAC TG	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F14	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	CAACTCCGT GA	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F15	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	TTGCGTTAGC AG	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F16	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	TACGAGCCCT AA	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F17	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	CACTACGCTA GA	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F18	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	TGCAGTCTC GA	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F19	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	ACCATAGCTC CG	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG
V3-341 F20	CCCCATCTCATCCCCCTGCGTGTCTCCCC GACTCAG	TGGACATCTC TT	GT	CCCCTACGGGAGGCA GCAG

V3-341 F: número de primer barcode; Ion torrent linker: secuencia adaptadora; Golay barcode: secuencia de identificación para secuenciación; Espaciador: secuencia GT entre el Golay barcode y secuencia primer; 16S rRNA Primer (5'-3'): primer para amplificación de la región V3

Tabla 6. Condiciones PCR barcodes para construcción de genoteca	
Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTPs	0.2mM
Primers (F o R)	0.2 μM
Taq pol	0.25U/ μM
mM: miliMolar; dNTPs: 2-desoxinucleósido trifosfato; Taq pol: Polimerasa Taq; Primers F: Forward; Primer R: Reverse.	

## 12. Apéndice de figuras



Figura 1. Mapa representativo de incidencia mundial del CaCu. En México, se resaltan en color rosa, los estados con mayor incidencia (tomado y modificado de GLOBOCAN, 2015). La intensidad del color azul, representa la incidencia de CaCu, así el color azul fuerte representa los países con mayor incidencia (>30.2) e inversamente los países representados en color azul claro, representan los países con menor incidencia de CaCu (<7.9).

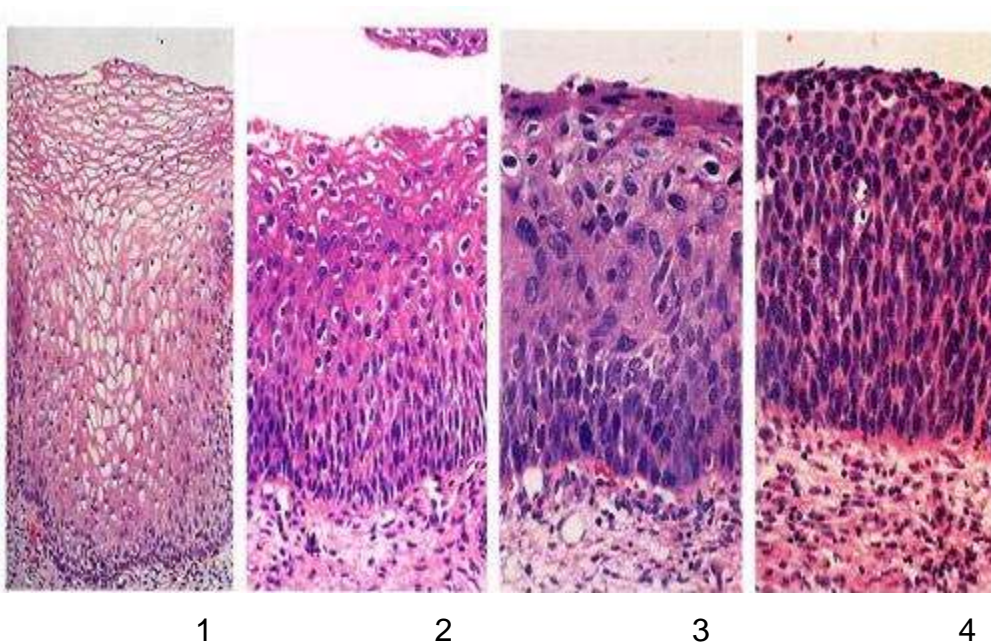


Figura 2. Microscopia de diferentes tejidos cervicales. Tejido normal: 1; Tejido con NIC 1: 2; Tejido con NIC 2: 3; Tejido con NIC 3: 4 (Cancer Quest: <https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/cancer-por-tipo/cancer-cervical>).

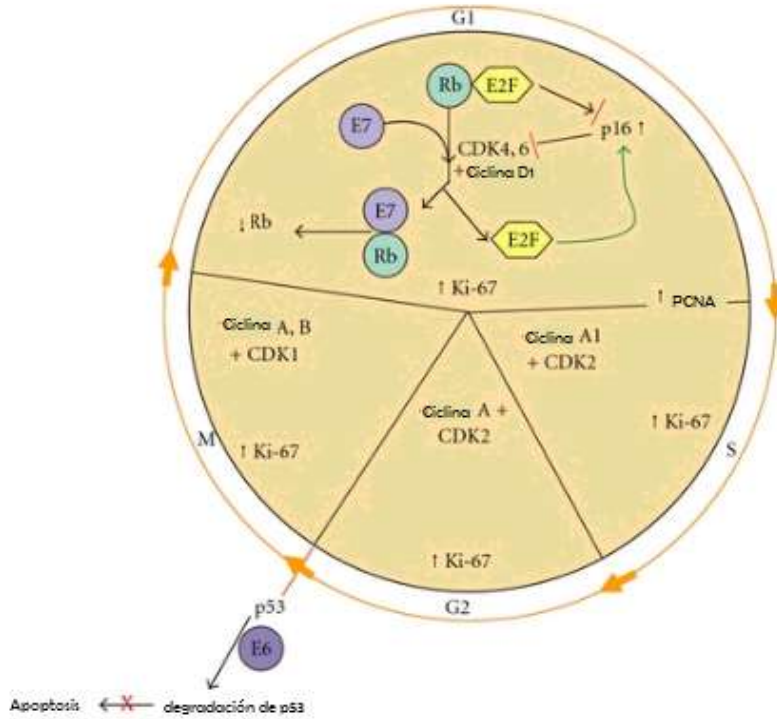


Figura 3. VPH y ciclo celular. La presencia de E7 interrumpe la regulación de fase G1-S a través de la interferencia con la unión E2F-Rb. P16 se expresa fuertemente debido a la pérdida de la represión Rb / E2F y la fuerte activación por E2F libre. La interacción de E6 con p53 resulta en ubiquitinación de p53 y su posterior degradación. Los marcadores de proliferación Ki-67 y PCNA aumentan su expresión (tomada y modificada de Brown *et al.*, 2012).

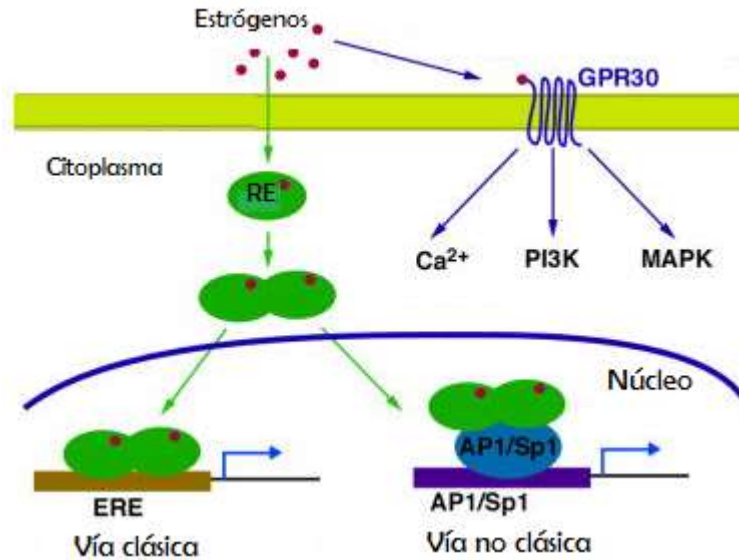


Figura 4. Participación del estrógeno en vías celulares. Algunas vías celulares activadas por estrógenos (Tomada y modificada de Chung *et al.*, 2010).



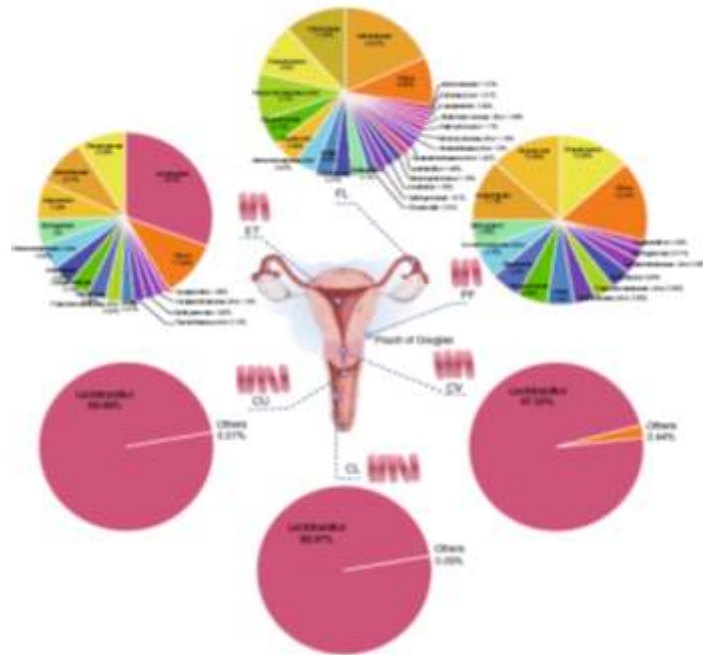


Figura 5. Composición de la microbiota del tracto genital femenino. CL-tercio inferior de la vagina, CU-fornix posterior, CV-canal cervical (Tomada y modificada de Chen et al., 2017).

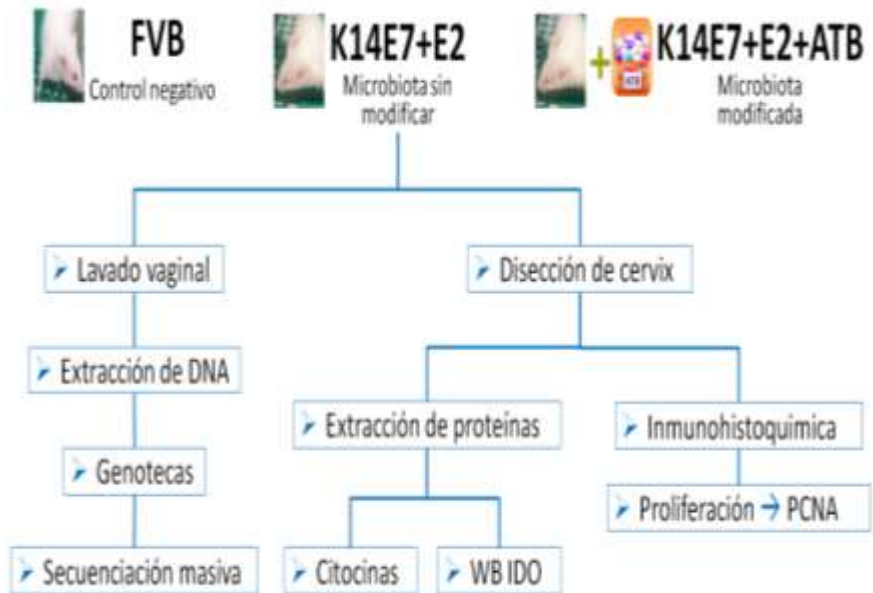


Figura 6. Esquema de plan de trabajo experimental. Se realizaron experimentos en los grupos FvB, K14E7+E<sub>2</sub> y K14E7+E<sub>2</sub>+ATB a los 3 meses de edad. Se realizó secuenciación masiva del DNA bacteriano proveniente de lavados vaginales, se detectaron citocinas e IDO de un lisado de proteínas provenientes del tejido cervicovaginal y se midió la expresión de PCNA en tejido cervical.

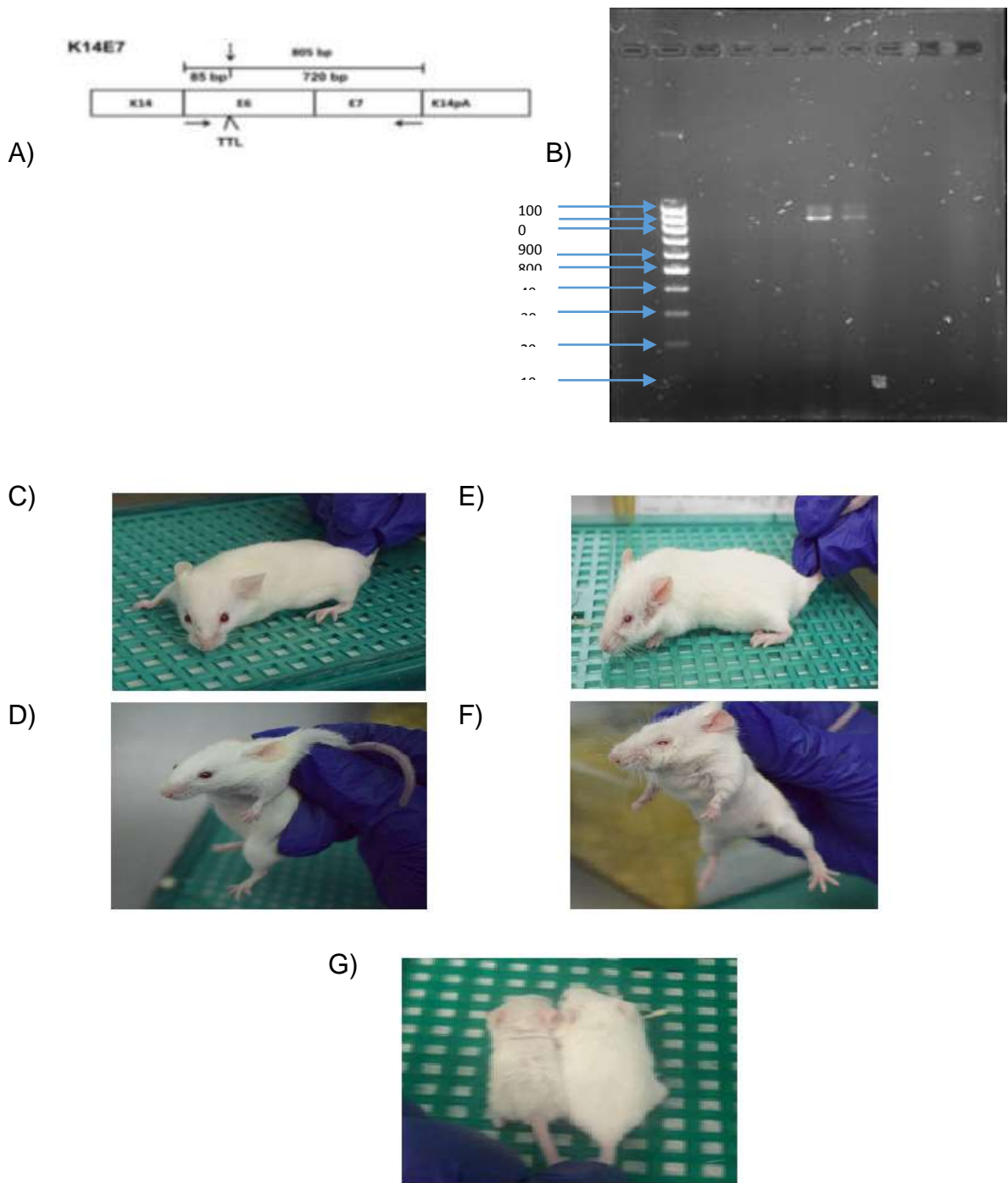


Figura 7. Representación genotípica y fenotípica del transgen de la cepa K14E7. A) Esquema del transgen y sus transcritos. B) Digestión enzimática del transgen. C) comparación del fenotipo de la cepa K14E7 y FvB.



Figura 8. Diagrama de tratamiento E<sub>2</sub>. Ratones K14E7 con un mes de edad se someten a cirugía para la implantación del pellet de E<sub>2</sub>. El proceso general consiste en hacer una pequeña incisión en dorso, implantar el pellet y suturar la herida con puntos. El tratamiento dura 60 días, por lo que al ratón se sacrifica antes de los 3 meses de edad.

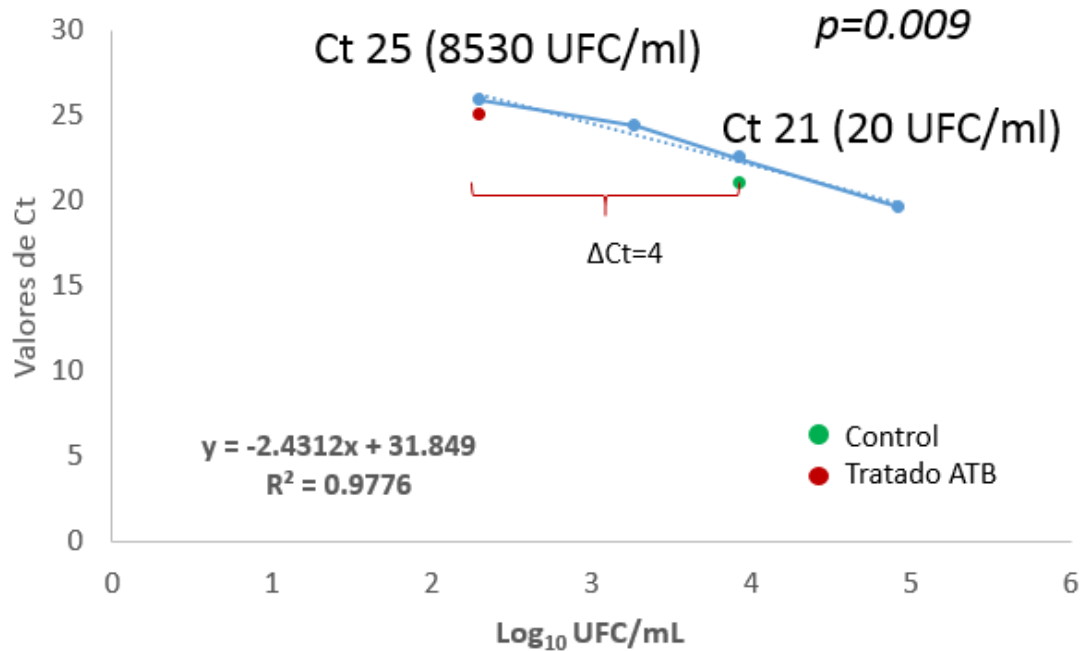
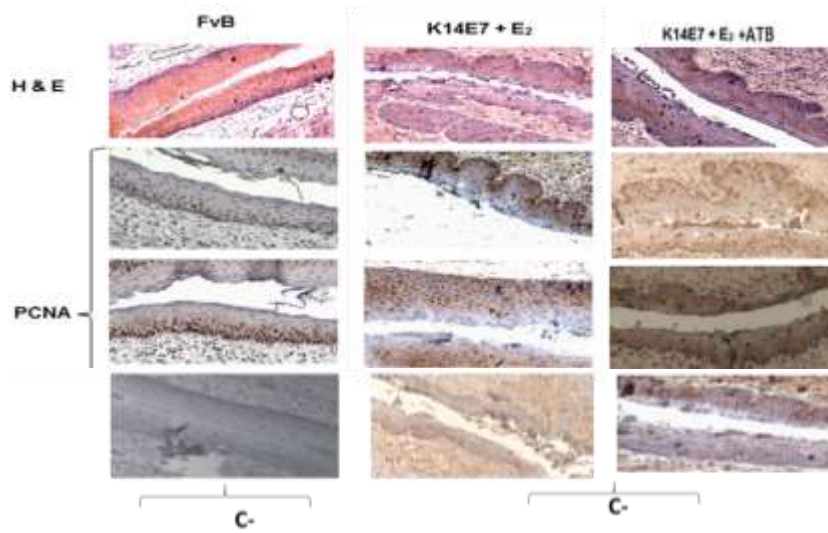


Figura 9. Relación de los valores de Ct vs Log<sub>10</sub> UFC/mL de cultivo de *E. coli* SK10019. Los puntos azules corresponden a la curva de calibración de Cts de las diluciones vs las UFC/ml; el punto verde corresponde al Ct sin ATB; y el punto rojo corresponde al Ct con ATB.

A)



B)



Figura 10. Histopatología y expresión de PCNA en tejido cervical. Se realizaron inmunohistoquímicas de tejido cervical de ratones FvB, K14E7+E<sub>2</sub> y K14E7+E<sub>2</sub>+ATB de tres meses de edad. A) La señal de color café representa las células positivas a PCNA. La tinción con hematoxilina y eosina, señalan el núcleo y citoplasma. Imágenes 10x. B) comparación de expresión de PCNA en tejido cervical.

A)



B)



Figura 11. Citología vaginal por medio de tinción Hematoxilina-Eosina. A) Muestra en estro de lavado vaginal de ratón FvB de 3 meses de edad. B) Muestra sin etapa definida del ciclo estral de ratones K14E7 tratados con E<sub>2</sub>.

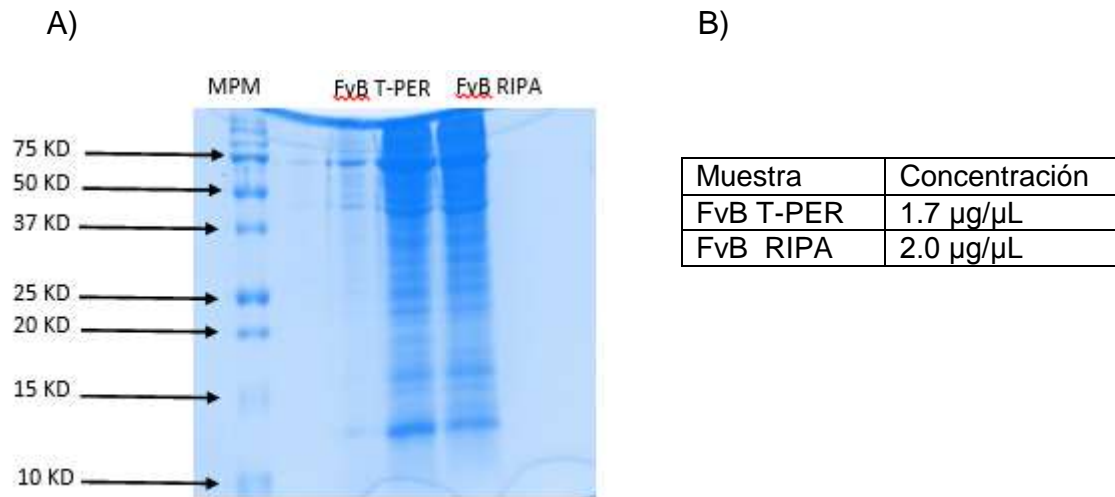
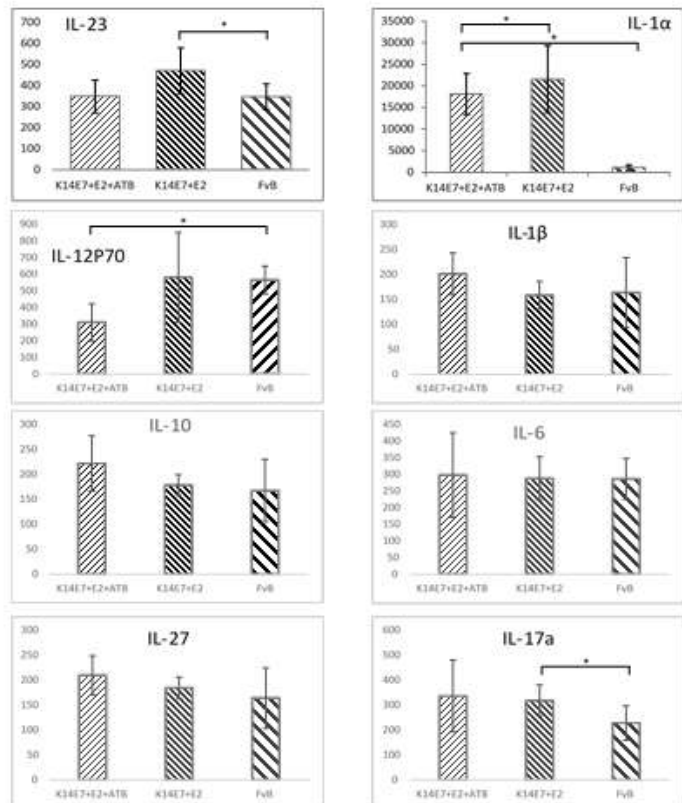


Figura 12. Comprobación de métodos de extracción de proteínas. A) SDS- PAGE (12%) de fracción de proteínas obtenidas de cervix de ratón FvB de 3 meses de edad. B) Cuantificación por método de Bradford de proteínas extraídas.

Figura 13. Intensidad Media de Florescencia de Interleucinas. Promedio de IMF medida por medio de citometría de flujo, de las ILs 23,1 $\alpha$ , 12p70, 10, 6, 27 y 17a en los grupos FvB, K14E7+E<sub>2</sub> y K14E7+E<sub>2</sub>+ATB a los 3 meses de edad.



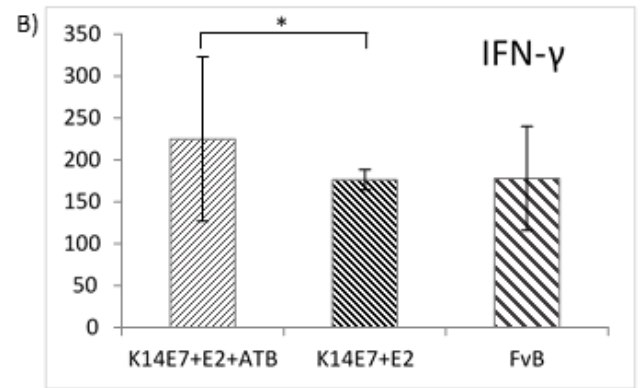
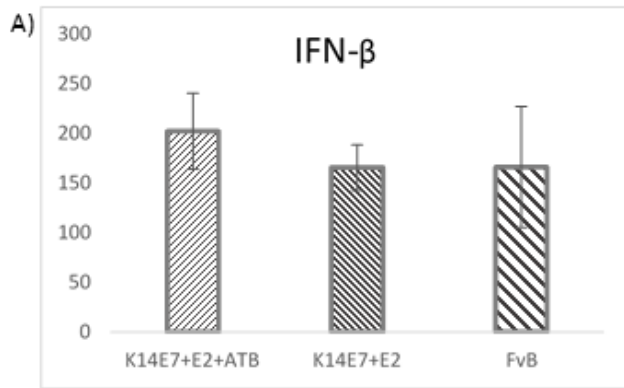


Figura 14. Intensidad Media de Florescencia de Interferones. Promedio de IMF medida por medio de citometría de flujo, de los INF-  $\beta$  y IFN- $\gamma$  en los grupos FvB, K14E7+E<sub>2</sub> y K14E7+E<sub>2</sub>+ATB a los 3 meses de edad.

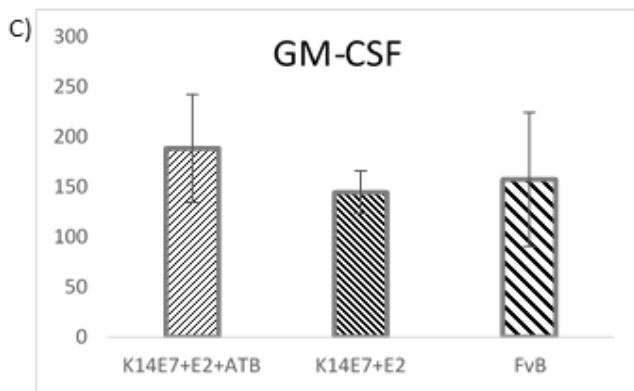
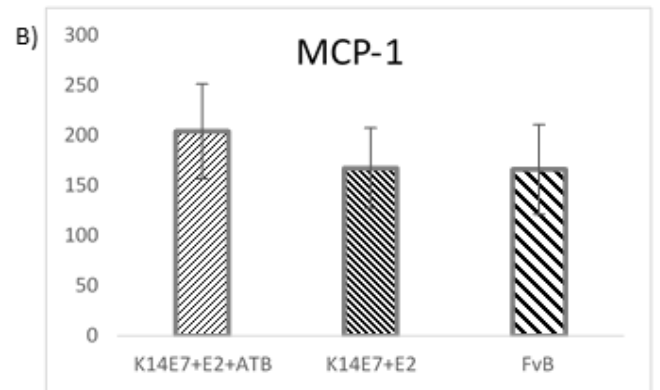
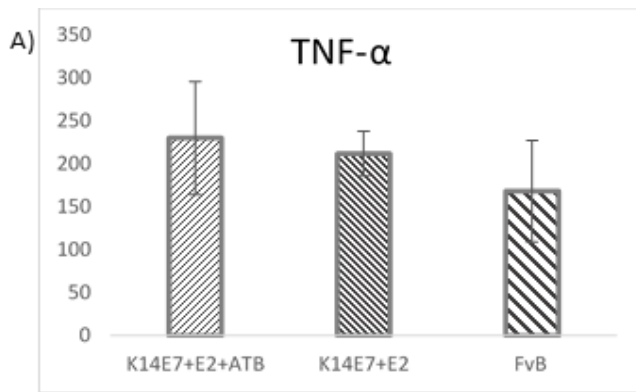


Figura 15. Intensidad Media de Florescencia de TNF- $\alpha$ , GM-CSF y MCP-1. Promedio de IMF medida por medio de citometría de flujo en los grupos FvB, K14E7+E<sub>2</sub> y K14E7+E<sub>2</sub>+ATB a los 3 meses de edad.

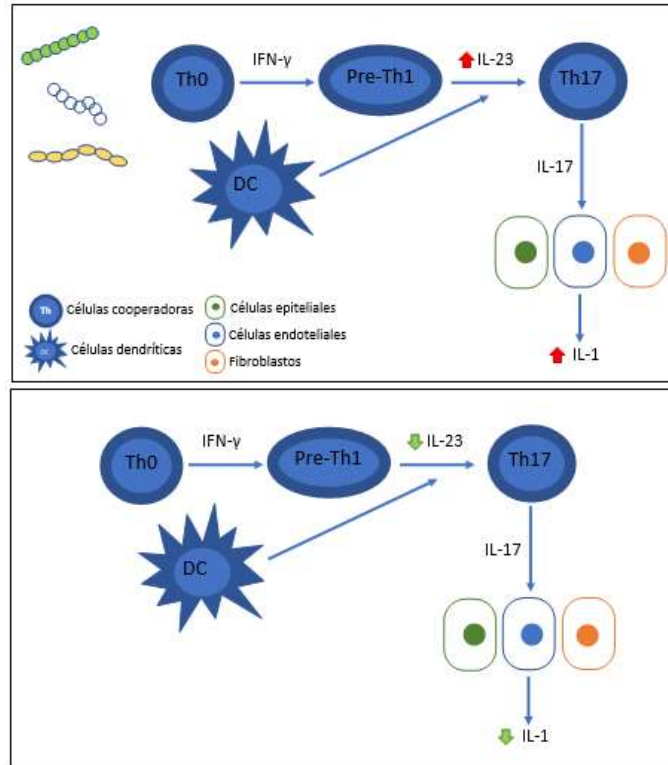


Figura 16. Citocinas IL-23 e IL-1  $\alpha$  en microbiota vaginal modificada. En la parte superior se representa la posible consecuencia de la presencia de la microbiota nativa en el ratón K14E7+E<sub>2</sub>. En la parte inferior se presenta la posible consecuencia de la presencia de la microbiota modificada con ATBs en el ratón K14E7+E<sub>2</sub> a los 3 meses de edad.

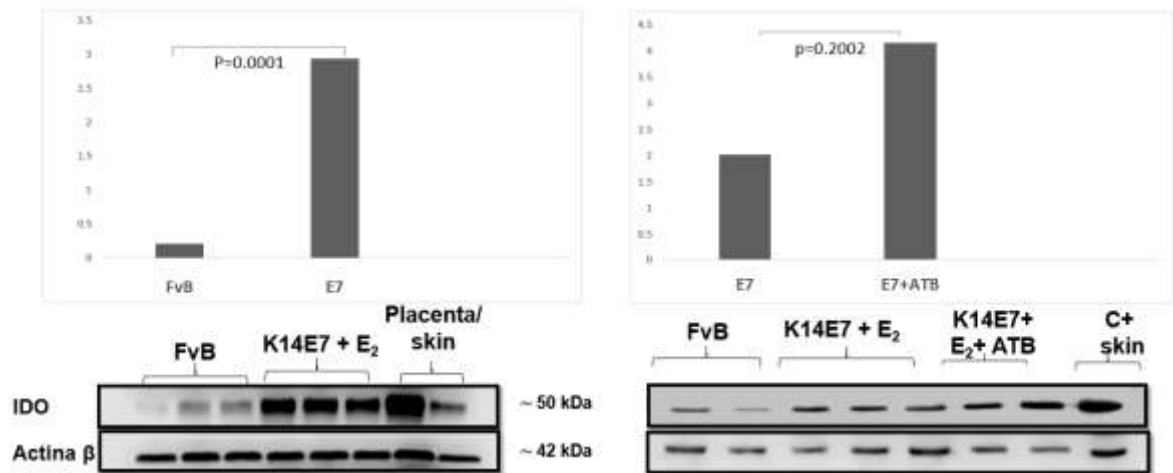
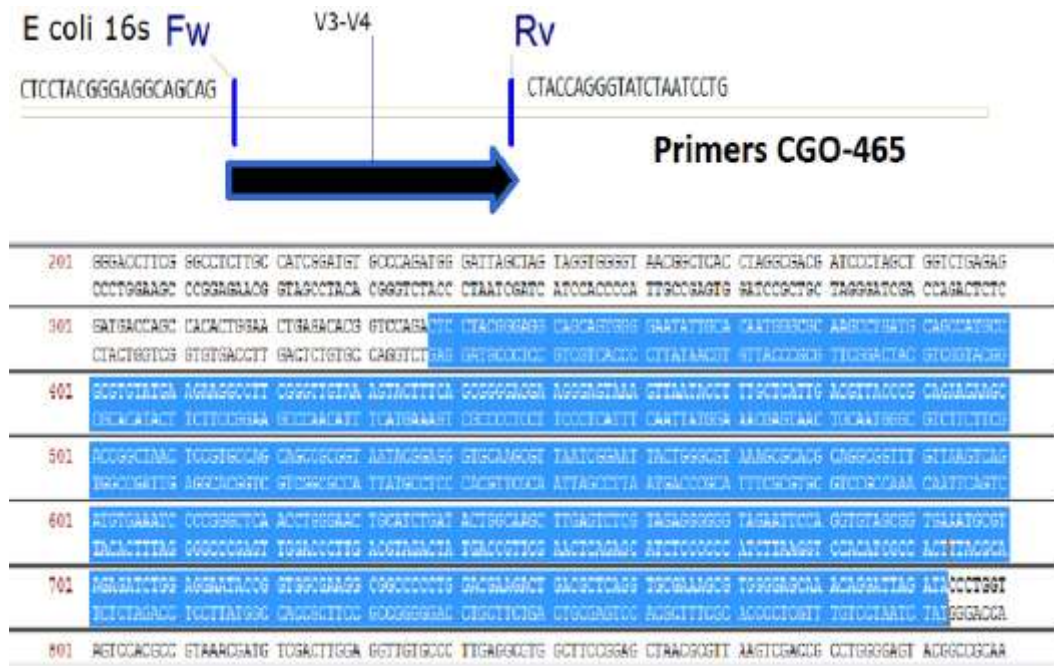


Figura 17. Expresión de IDO en tejido cervico-vaginal. Se evaluaron los grupos FvB, K14E7+E<sub>2</sub>, K14E7+E<sub>2</sub>+ATB de 3 meses de edad. De control positivo se usó placenta y piel de ratón FvB. Como control de carga se usó actina β.

A)



B)

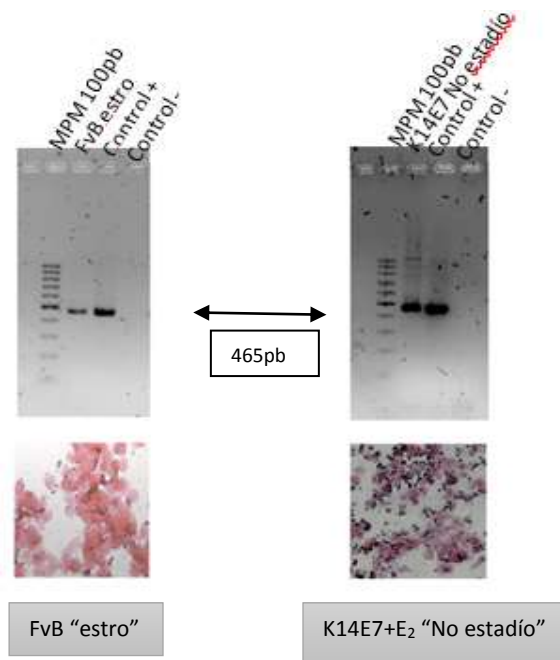


Figura 18. Amplificación de la región variable V3-V4 del gen ribosomal 16s. A) Región amplificada (465 pb) por los primers CGO 465 (señalada en azul). B) Gel de agarosa al 1,5% para electroforesis; MPM (Marcador de peso molecular), grupo respectivo de ratones de 3 meses de edad, como control positivo DNA de la cepa pnpΔ683 y control negativo (sin DNA) . En la parte inferior a cada imagen, se señala la citología correspondiente al ciclo estral: estro para FvB y "No estadio" para el grupo K14E7+E<sub>2</sub> (debido al tratamiento hormonal).



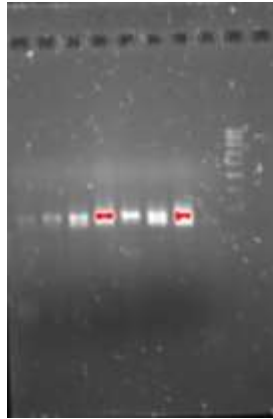


Figura 19. Ejemplo de amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S usando los primers Barcodes. Se representa el tamaño de la amplificación de 281pb en gel de agarosa al 2%, teñido con Midori Green.

A)

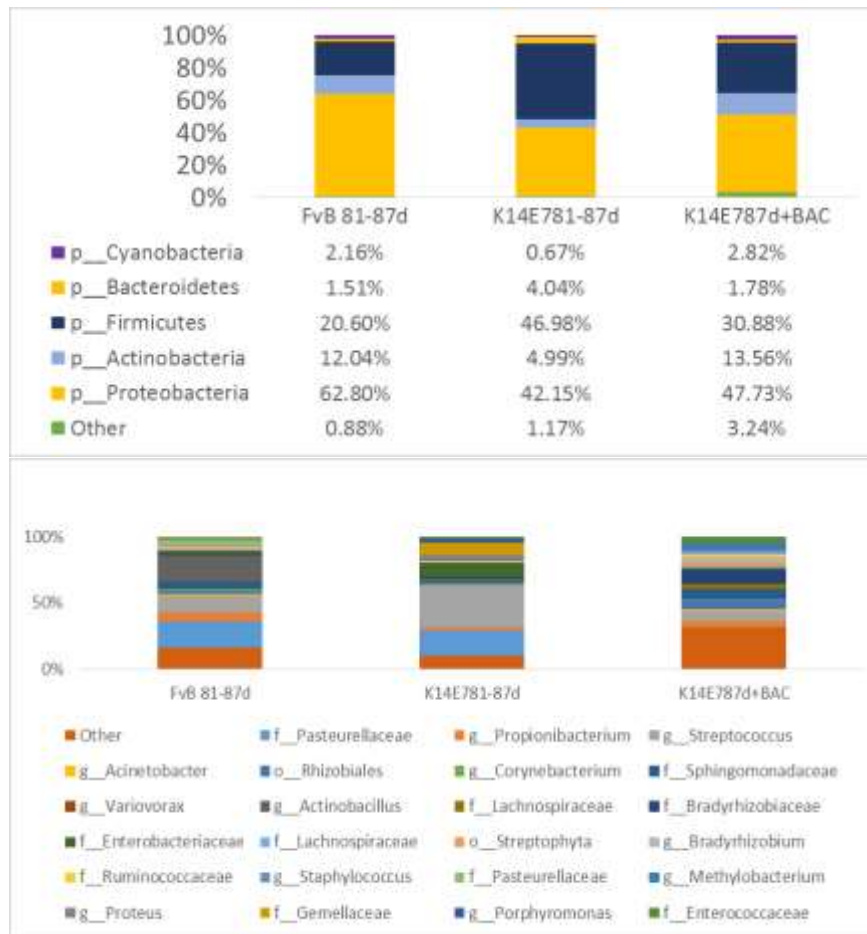


Figura 20. Datos de abundancia relativa de microbiota vaginal de lavados vaginales por grupo. A) abundancia relativa a nivel Filo. B) abundancia relativa a nivel orden, familia y género.

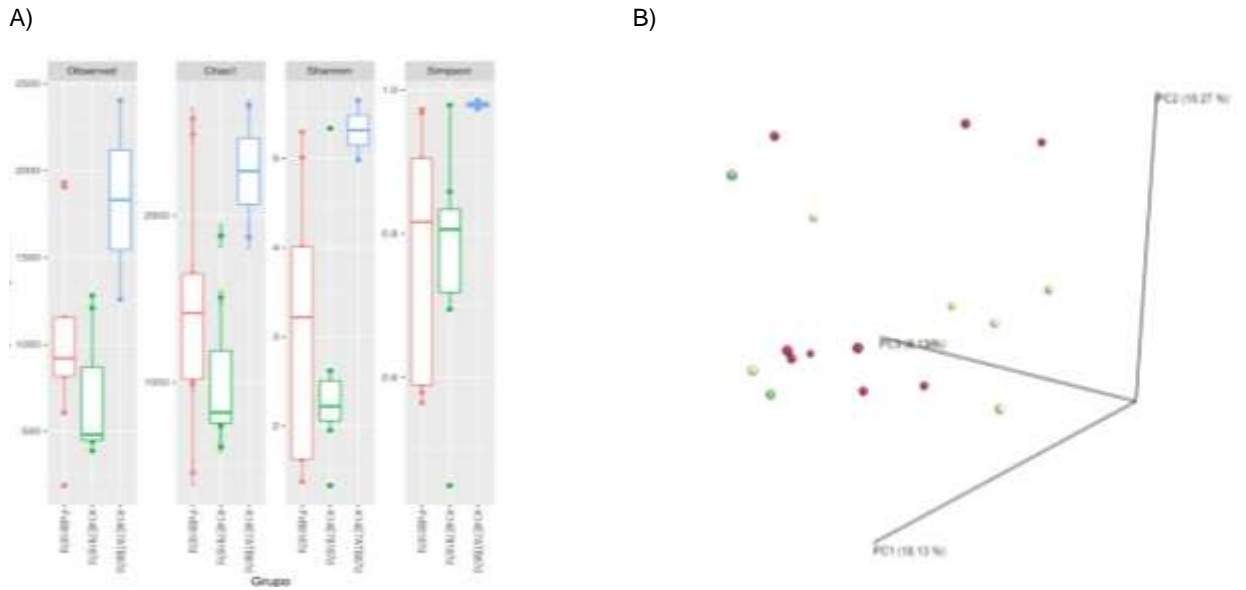


Figura 21. Análisis de Diversidad. A) Diversidad beta; se incluyen los índices: observado, Chao 1, Shannon y Simpson. B) Diversidad beta, compuesto por coordenadas principales.

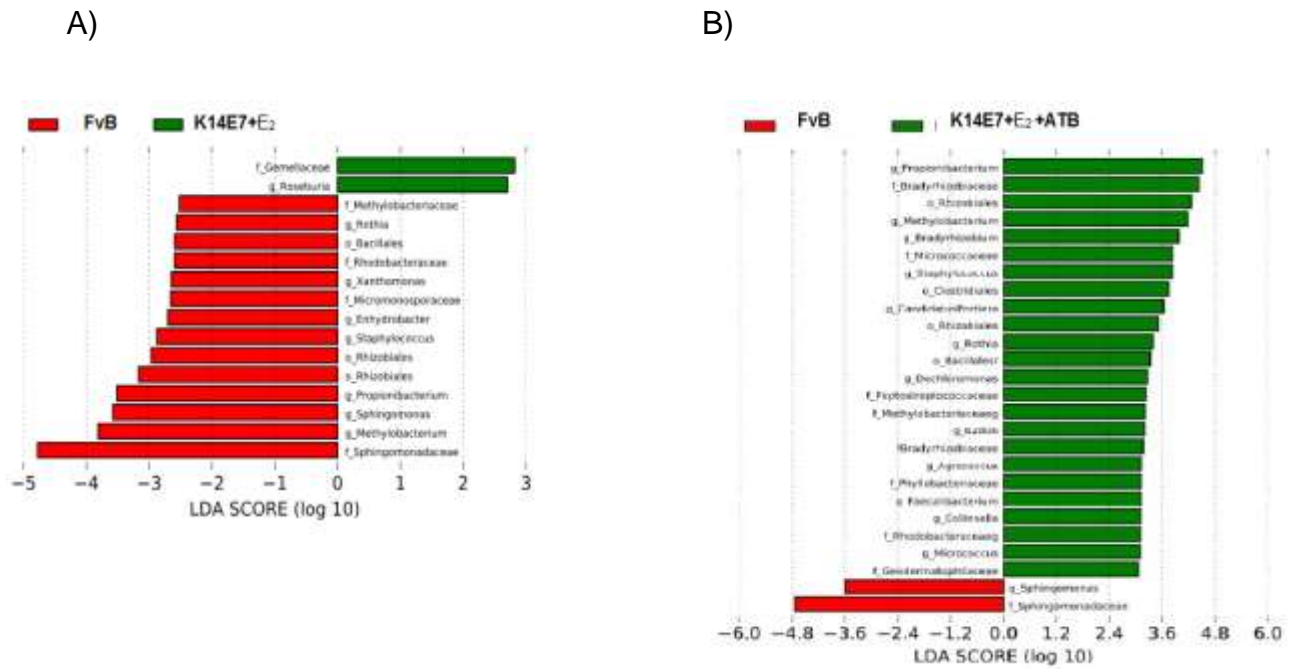


Figura 22. Resultados de análisis LefSe de datos secuenciados. A) Comparación entre los grupos FvB y K14E7+E<sub>2</sub> de 3 meses de edad. B) Comparación entre los grupos FvB y K14E7+E<sub>2</sub>+ATB.

