

Instituto Nacional  
de Salud Pública

**Asociación de la composición de la microbiota y el perfil de  
citocinas en cérvix con los distintos estadios de la historia  
natural del cáncer cervicouterino**

**Autora:** Astride Stephanie Audirac Chalifour

**Tesis para la obtención del grado:**

Maestría en Ciencias en Enfermedades infecciosas

Generación 2013-2015

**Director:** Dr. Vicente Madrid Marina

**Asesores:** Dra. Kirvis Janneth Torres Poveda

Dr. Juan Mauricio Téllez Sosa

**Lector Externo:** Sergio Encarnación Guevara

**Cuernavaca Morelos 07/08/2015**

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a Dios por haberme permitido vivir y concluir esta etapa de mi desarrollo profesional, al conocer al Dr. Vicente Madrid Marina y la Dra. Kirvis Janneth Torres Poveda, quiénes me informaron sobre los programas de posgrado del INSP, y me contagiaron ese ánimo y gozo por la investigación. Agradezco al Dr. Madrid por sus enseñanzas, el espíritu de lucha, perseverancia y buen humor, por sus valiosas aportaciones en el desarrollo de la discusión de esta tesis y por la confianza que depositó en mí para llevar a cabo este proyecto. Agradezco a Kirvis Janneth Torres Poveda por su tutoría y valiosa retroalimentación en todas las presentaciones, análisis estadístico y la redacción de esta tesis, pero sobre todo por su amistad y ejemplo de trabajo.

Quiero agradecer a todos los que estuvieron involucrados en este proyecto: a la MC Margarita Bahena por su dedicación, disciplina y paciencia en la preparación de los amplicones, a Juan Mauricio Téllez Sosa y Rosa Elena Gómez Barreto por hacer la secuenciación, haberme mostrado el proceso y haber atendido mis dudas al respecto amablemente. Gracias al Dr. Jesus Martínez Barnetche por estar al pendiente de los resultados de la secuenciación, a Juan Tellez por dedicar parte de su tiempo a la lectura y correcciones de este documento. Agradezco a la Dra. Ana Isabel Burguete por su asesoría respecto a los análisis estadísticos, a la Dra. Carla Contreras y el C. Dr Alfredo Lagunas por su valiosa retroalimentación en los seminarios, al Dr. Sergio Encarnación Guevara por la revisión de este documento, como lector externo.

Gracias a Bernardo Cortina por su ayuda en el análisis bioinformático, a Andrés Aguilar por su ayuda en aprender a usar el sistema operativo Ubuntu y rescatar mi computadora en múltiples ocasiones, a Ernestina Godoy por su ayuda en el aprendizaje del uso de R, a Guillermo Romero por conseguirme artículos para el marco teórico y discusión; a mis compañeros de generación Crysele Calderón Corona y José Antonio Anaya García por su compañía en los desvelos a causa de estudio o celebración, por su ayuda para resolver dudas, su amistad y valiosa retroalimentación

en los seminarios de tesis. Gracias a mis compañeros de laboratorio porque de cada uno algo aprendí: Cecilia, Jesús Reyna, Magali, David, Lety y Liliana. Gracias a mis compañeros de la escuela de salud pública y personas que atribuyeron de manera directa o indirecta a llevar a término este proyecto.

Gracias al Dr. Ken Dewar, que me mostró como corroborar los resultados de clasificación de los OTUs, por su ayuda a darle solidez a los análisis bioinformáticos y por ampliar mi conocimiento sobre tecnologías de secuenciación; a Amanpreet Kaur y Caroline Vincent por compartir sus scripts y conocimiento sobre análisis bioinformático.

Quiero agradecer a mi amada familia: mis papás Henri Audirac Lass, Claude Chalifour Boivert y sus respectivos esposos, Lourdes del Rayo Torres Pérez y Michael Pacitti, a mis tíos Eric Audirac Lass y Mariko Kushida, mis hermanos Félix, Lorena, Karen, Diana, Camilla, Alessandro, Sofía, Sandra León y Alejandra Maldonado y a los más pequeños, mis sobrinos: Lía, Emma y Axel, por ser parte de mi identidad, soporte e inspiración.

Por último agradezco a las instituciones: al CONACyT por financiar mi sustento en estos dos años, y por los fondos que destina a la investigación en México y al Instituto Nacional de Salud Pública, por las clases, los congresos, la enseñanza de lo que significa salud pública, el desarrollo profesional y de mi paciencia.

## **Dedicatoria**

Le dedico esta tesis a Dios, a mi familia y amigos.

## Índice de contenido

Agradecimientos .....	1
Dedicatoria .....	2
Índice de contenido .....	3
Introducción .....	5
Planteamiento del problema .....	6
Marco teórico.....	7
Epidemiología.....	7
Historia Natural del CaCU .....	10
Respuesta inmune a la infección por el VPH y CaCU.....	13
Microbiota.....	15
Interacciones entre la microbiota & sistema inmune .....	21
Métodos para el estudio de la microbiota.....	22
Justificación .....	24
Objetivos.....	25
Objetivo general: .....	25
Objetivos específicos: .....	25
Material y Métodos .....	26
Hipótesis .....	26
Diseño del estudio.....	26
Población de estudio .....	26

Estrategia metodológica .....	29
Metodología para objetivo 1 .....	30
Metodología para objetivo 2 .....	36
Metodología para objetivo 3 .....	37
Metodología para objetivo 4 .....	38
Metodología para objetivo 5 .....	39
Resultados.....	39
Discusión .....	56
Conclusión.....	61
Perspectivas .....	62
Limitaciones del estudio .....	63
Consideraciones éticas y de bioseguridad .....	63
Recursos materiales y financiamiento .....	63
Anexo 2. Cartas de aprobación de las Comisiones de Bioseguridad, Ética en Investigación e Investigación del Proyecto Madre al que estuvo anidado el presente estudio.....	70
Anexo 3. Rangos dinámicos para el análisis de expresión de citocinas a nivel del cérvix .....	73
Referencias .....	76

## Introducción

En México, mueren por cáncer cervicouterino (CaCU) anualmente aproximadamente 5,000 mujeres con una incidencia de 10,186 casos, por lo que continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país<sup>1</sup>. Para que una mujer desarrolle CaCU, la infección por el Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR) es necesaria pero no suficiente<sup>2</sup>. Se estima que, alrededor del 98% de las mujeres que se infectan con VPH, eliminan al virus de manera espontánea en los dos primeros años de la infección, mientras en el 2% persiste la infección por VPH-AR y el 1% llega a desarrollar CaCU si no reciben el tratamiento oportuno<sup>3</sup>. La persistencia viral del VPH en cérvix se ha asociado con una inmunosupresión local, favorecida por la expresión de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ 1<sup>4,5</sup>, las cuales a su vez son reguladas por el VPH<sup>6,7</sup>. Altos niveles de expresión del ARNm de IL-10 han sido asociados a polimorfismos en la región reguladora del gen codificante de IL-10. Tales polimorfismos se presentaron con mayor frecuencia en pacientes en estadios avanzados del cáncer<sup>8,9</sup>.

Por otra parte, se ha reportado en estudios de microbiota de vagina e intestino, que la microbiota ejerce una presión selectiva sobre el tipo de citocinas que se secretan en el tejido en donde se encuentra presente<sup>10,11</sup>. Por lo que existe la posibilidad de que una microbiota determinada sea un co-factor en el desarrollo de la enfermedad.

Existen pocos estudios de la microbiota de cérvix, el sitio anatómico más próximo y estudiado es la vagina; por lo que el presente estudio es original y de carácter exploratorio, en la investigación de la asociación entre la diversidad y composición de la microbiota de cérvix en los estadios de la historia natural del CaCU y el perfil de expresión de citocinas a nivel de cérvix.

## Planteamiento del problema

Existen estudios previos que han reportado el perfil de citocinas expresadas en los distintos estadios del CaCU en diferentes poblaciones étnicas; la mayoría de estudios reportan<sup>4,5,6,12</sup>:

- En mujeres sin lesión en cérvix VPH negativas: el predominio de una respuesta tipo Th1 (IL-2, INF- $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), que es la más efectiva para la eliminación de infecciones virales. Se encuentran niveles altos de INF- $\gamma$ , IL-2 y en menor cantidad respuesta tipo Th3 (TGF- $\beta$ 1).
- En mujeres sin lesión en cérvix VPH positivas: sigue el predominio de la respuesta tipo Th1. Se encuentran niveles altos de INF- $\gamma$ , IL-2 y en menor cantidad TGF- $\beta$ 1 e IL-10.
- En mujeres con Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG): predomina TNF- $\alpha$ , hay expresión de INF- $\gamma$ , y se inicia la expresión de citocinas anti-inflamatorias Th2 (IL-10, IL-6, IL-4).
- En mujeres con Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado (LEIAG): se suprime la expresión de citocinas Th1 e incrementa la expresión de citocinas Th2 y Th3.
- En CaCU, la expresión característica es de un perfil de citocinas predominantemente tipo Th2 y Th3 e indetectable el perfil Th1.

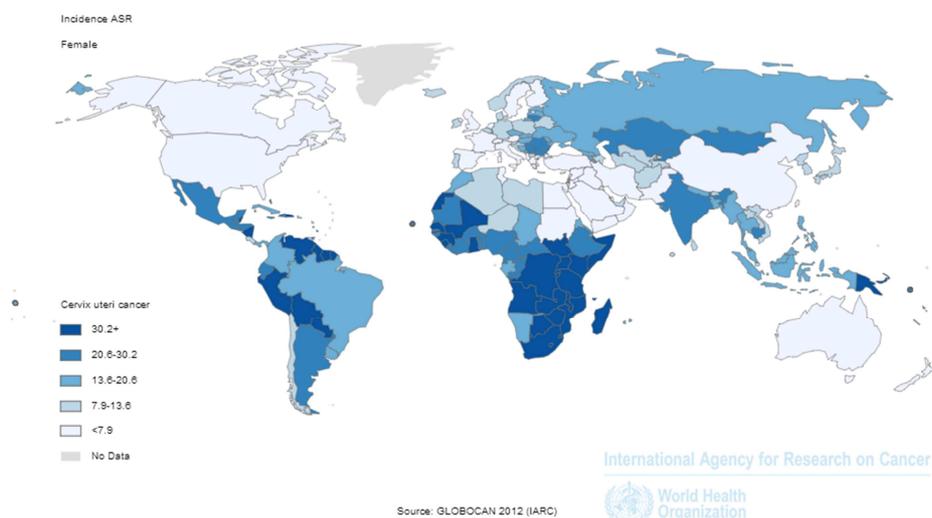
Al analizar estos perfiles se observa que durante el progreso de la enfermedad hay un cambio del tipo de citocinas expresadas de Th1 a Th2, y consecuentemente, un cambio en la respuesta inmune que se efectúa en el sitio de la infección. Se ha reportado también que, de manera especie específica, las bacterias ejercen una presión selectiva en el tipo de citocinas que se expresan en modelos de intestino y de vagina, lo que lleva a pensar que una microbiota determinada podría ser un co-factor para el desarrollo de cáncer cervicouterino. En este sentido, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

**¿Existen diferencias entre la diversidad o composición de la microbiota y el perfil de citocinas del cérvix de mujeres sin lesión VPH negativo y positivo, con lesiones escamosas intraepiteliales y con CaCU?**

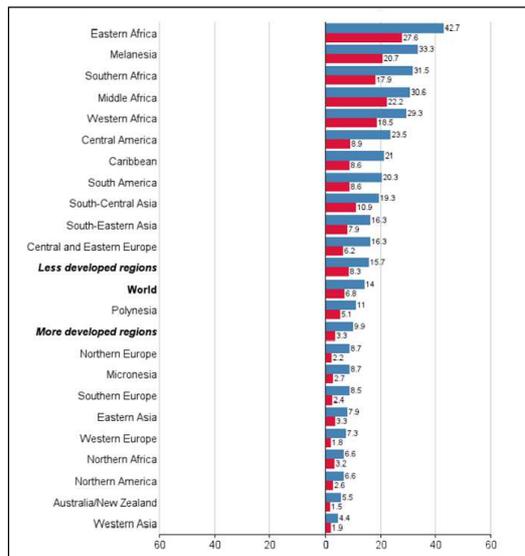
## **Marco teórico**

### **Epidemiología**

Actualmente, el CaCU es la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial<sup>13</sup>, por lo que sigue siendo un problema de salud pública. La incidencia acumulada del CaCU (Figura 1) y su mortalidad se distribuye de manera irregular en el mundo (Figura 2), siendo más afectados los países en desarrollo o de tercer mundo, dónde es la primera o segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. Las zonas más afectadas son los países de América Latina, países de África, India y Mongolia, con tasas estandarizadas por edad de incidencia mayores a 20.2 casos por 100,000 mujeres por año<sup>14</sup>.



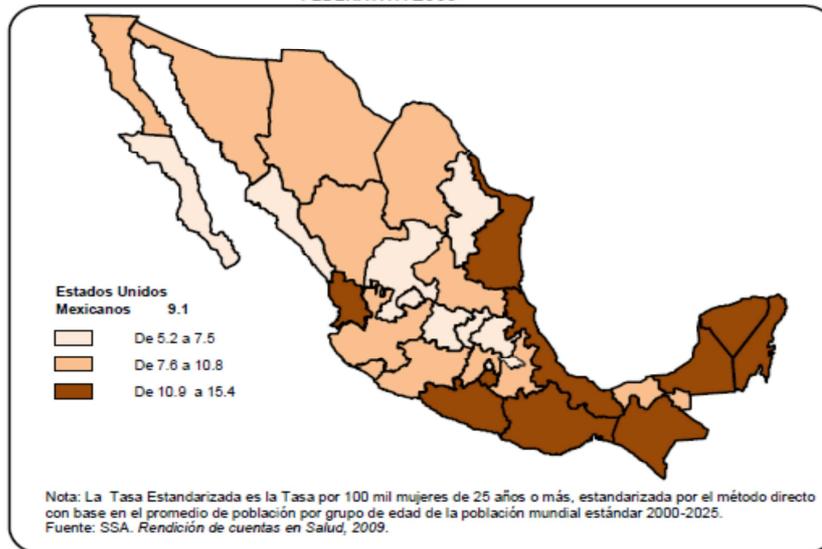
**Figura 1. Tasas de Incidencia estandarizadas por edad de cáncer cervicouterino por 100,000 mujeres-año por país, estimadas para 2012. Disponible en <http://globocan.iarc.fr/>. Fecha de consulta: julio 27, 2015.**



**Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad estandarizada por edad por 100,000, por región geográfica a nivel mundial. Disponible en <http://globocan.iarc.fr/>. Fecha de consulta: julio 27, 2015.**

En México, el CaCU es la segunda causa de muerte por neoplasias, en el año 2009 representó el 11.5% de las muertes por tumor maligno en mujeres de 25 años y más. Los estados del sur y sureste del país son los más afectados con una tasa de mortalidad mayor a la media nacional (Figura 3)<sup>15</sup>. Los datos más recientes de mortalidad por CaCU en México fueron reportados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, en 2011, el CaCU fue el segundo tumor maligno por el cual fallecieron las mujeres en México (10.4%) y al analizarlo por grupos de edad, en las mujeres de 40 a 49 años hay 10 muertes por cada 100 mil mujeres de, de 65 a 74 años 30 de cada 100 mil, y 55 muertes por 100 mil mujeres en las mujeres mayores de 80 años y más (INEGI, 2012)<sup>16</sup>.

TASA ESTANDARIZADA DE MORTALIDAD POR CÁNCER CÉRVICO-UTERINO POR ENTIDAD FEDERATIVA 2009



**Figura 3. Tasa de mortalidad por CaCU estandarizada por 100,000 mujeres de 25 años o más en México reportada en 2009. Tomada y adaptada del comunicado social num. 267/11 de INEGI Aguascalientes AGS. 2011.**

De acuerdo a las estadísticas del Instituto Catalán de Oncología (ICO) y el Centro de Información sobre el VPH de la OMS, en México existen 46.6 millones de mujeres mayores de 14 años en riesgo de desarrollar CaCU. En 2012 se diagnosticaron 10,186 casos nuevos y 5,061 mujeres murieron a causa del CaCU<sup>17</sup>.

Se requiere de una infección persistente por VPH-AR para desarrollar CaCU<sup>18,19</sup>. En las gráficas que se presentan a continuación (Figura 4) se representan los resultados de un estudio realizado en una cohorte de Guanacaste, Costa Rica, donde se estimó la prevalencia del VPH. En este estudio se reporta la eliminación del virus en 85% de las mujeres evaluadas a los 84 meses de seguimiento, un porcentaje pequeño mantiene la infección sin progresión a cáncer y aproximadamente 5% de las mujeres con neoplasia intraepitelial cervical de segundo grado (NIC2) progresa a cáncer. La gráfica inferior muestra los resultados específicamente para el VPH-16, donde se observa que 70% de las mujeres evaluadas eliminan el virus, 8% mantiene la infección con NIC2 sin

progresión y 22% de las mujeres infectadas con VPH-16 desarrollan CaCU. Lo que hace al VPH-16 uno de los subtipos virales más agresivos<sup>20</sup>.



**Figura 4. Prognosis del estudio de prevalencia de todos los tipos de VPH (izquierda) y VPH-16 (derecha) en la cohorte de Guanacaste, Costa Rica. NIC: Neoplasia Intraepitelial de Cérvix. Figura tomada del artículo de Bosch FX et al. 2008<sup>18</sup>**

En el caso de México, una revisión sistemática reciente reportó datos de prevalencia y distribución de genotipos de VPH en mujeres mexicanas con CaCU, con lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado y con citologías normales.

Los genotipos más frecuentes fueron: VPH 16 (63.1%), VPH 18 (8.6%), VPH 58 y VPH 31 (5%) para CaCU; VPH 16 (28.3%), VPH 58 (12.6%), VPH 18 (7.4%), VPH 33 (6.5%) para lesión de alto grado; VPH 16 (13.1%), VPH 33 (7.4%), VPH 18 (4.2%) y VPH 58 (2.6%) para lesión de bajo grado, y VPH 16 (3.4%), VPH 33 (2.1%), VPH 18 y VPH 58 (1.2%) para citologías normales<sup>21</sup>.

### Historia Natural del CaCU

La infección por el VPH se transmite por relaciones sexuales. De manera que hombres y mujeres participan en la cadena epidemiológica de la infección, pueden ser portadores asintomáticos, transmisores y también desarrollar la infección por el VPH<sup>22,23</sup>.

Los factores de riesgo asociados con la infección por el VPH están claramente relacionados con el comportamiento sexual de la persona<sup>24</sup>. Los más importantes son: la edad temprana en el inicio de las primeras relaciones sexuales, número elevado de parejas sexuales a lo largo de la vida, los contactos sexuales con personas de alto riesgo<sup>25</sup> (en los hombres, el contacto frecuente con las mujeres que ejercen la prostitución y en las mujeres, contactos frecuentes con hombres con múltiples parejas sexuales). La circuncisión masculina y el uso estricto y sistemático de condones son los factores que pueden reducir, aunque sin prevenir totalmente, el riesgo de transmisión del VPH entre parejas sexuales<sup>26</sup>.

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae y es un virus con cápside icosaédrica que contiene ADN de doble cadena circular. Su genoma mide alrededor de 8 Kb, lo conforman tres oncogenes (E6, E7 y E5) que participan en el proceso de transformación de las células epiteliales, tres genes que codifican proteínas reguladoras (E1, E2 y E4), que modulan la transcripción y replicación del genoma viral y dos genes que codifican a las proteínas estructurales (L1 y L2), las cuales forman parte de la cápside<sup>27</sup>. La expresión de los genes cambia según el nivel de diferenciación de la célula infectada y etapa de la enfermedad<sup>28</sup>.

La infección por el VPH es generalmente transitoria y 50% de ellas desaparece al cabo de seis meses, mientras que 90% lo hace en dos años, y sólo 10% de los casos persisten. Esto ocurre sin algún tipo de tratamiento, por efecto de las defensas inmunológicas de la persona afectada<sup>3</sup>. Cuando la infección es productiva, es decir, cuando el virus hace que la célula infectada produzca nuevas partículas virales, el ADN viral permanece en forma episomal (no integrado al genoma) en el núcleo y no hay posibilidad de transformación maligna. Por el contrario, cuando la infección es persistente (más de dos años) y por un genotipo oncogénico, el riesgo de desarrollar cáncer es mayor. Para que esto último ocurra, no basta con las dos condiciones anteriores, es necesaria la acción de uno o varios co-factores que favorecen el desarrollo de CaCU: inmunosupresión a nivel del cérvix; susceptibilidad genética individual (polimorfismos en el gen HLA-complejo principal de histocompatibilidad,

AKNA, IL-10, IL-4 y IL-6 entre otros)<sup>8,8,9,29,30,31</sup>, deficiencia de vitaminas A, C, E o zinc; co-infecciones por *Chlamydia*, Herpes y VIH, consumo de anticonceptivos por un periodo mayor a cinco años<sup>25</sup> y el tabaquismo<sup>32</sup>.

El VPH entra a través de una microlesión (Figura 5) e infecta a las células basales del epitelio del cérvix, donde empieza a expresar las proteínas tempranas E1, E2 y E4, que en conjunto llevarán a cabo la replicación viral; la expresión de E6 y E7 es mínima en presencia de E2, porque esta última inhibe su actividad. El cromosoma viral se mantiene como un episoma extranuclear hasta que integra su genoma viral al de la célula<sup>33</sup>. El corte realizado para la inserción del genoma viral parte el gen E2, lo que elimina su expresión y por lo tanto aumenta la actividad de las oncoproteínas E6 y E7. Este evento da lugar a la progresión a cáncer invasor.<sup>34</sup> E6 ubiquitina a p53 para su degradación, anulando así su actividad que es clave en el control del ciclo celular, ya que detiene el proceso de síntesis o el de mitosis en presencia de daño al ADN celular. E7 se une a Rb evitando su unión al factor de transcripción E2F permitiendo que la célula entre en fase de replicación del ADN, paso esencial para la replicación viral. Además E6 y E7 interactúan con otras proteínas celulares como la proteína activadora 1 (AP-1), c-Myc, E2F-1, p21, p27 y TBP (involucradas en el control del ciclo celular), lo que resulta en una inestabilidad genómica creciente que permite el cúmulo de mutaciones genéticas, la pérdida del control del crecimiento celular y el desarrollo del cáncer<sup>35</sup>.

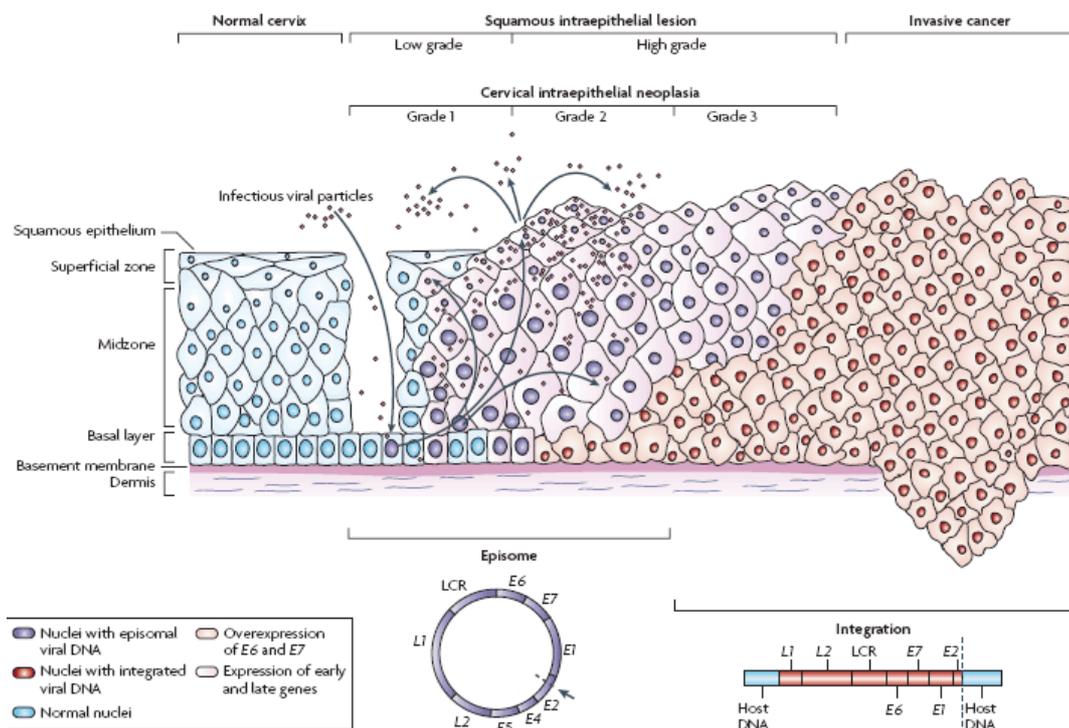


Figura 5. Historia natural del CaCU figura tomada del artículo de Woodman CBJ et al. 2007<sup>34</sup>.

La historia natural del CaCU se puede dividir en cuatro etapas, de acuerdo a su histología, un momento inicial de infección donde no hay lesión, cuando hay aparición de LEIBG, cuando progresa a LEIAG y la etapa de cáncer invasor. La producción de viriones solo se lleva a cabo en capas externas del epitelio, donde se lleva a cabo la descamación del epitelio. Este comportamiento ayuda al virus a pasar desapercibido ante el sistema inmune<sup>36</sup>.

### Respuesta inmune a la infección por el VPH y CaCU

La primera barrera contra la infección por el VPH es la respuesta inmune innata, en la cual las células epiteliales por medio de los receptores tipo toll (TLR), reconocen patrones moleculares de patógenos y activan la cascada JAK/STAT para culminar en la activación del factor NFκB, que se une al ADN y favorece la expresión de IFN tipo I ( $\alpha/\beta$ ), TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; esto favorece la activación de macrófagos, células NK y del

inflammasoma. En la infección por VPH-AR existe una represión de los TLR9 que no sucede con los de bajo riesgo. Las proteínas E6 y E7 interrumpen la respuesta al IFN tipo 1, al interferir en la cascada de señalización de JAK/STAT y evitar la fosforilación de STAT que se une a IRF-1. IFN $\gamma$ , secretado por los queratinocitos, también es reprimido de manera epigenética por E6 y E7 de los VPH-AR<sup>37</sup>.

Las mujeres que logran eliminar la infección presentan un infiltrado linfocítico de células TCD4+ en su mayoría y CD8+<sup>37</sup>, los cuales son activados posteriormente por la presentación antigénica en los ganglios linfáticos por células de Langerhans. Las células CD4+ producen las citocinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12. Dicha respuesta va dirigida a las proteínas E2 y E6 en distintos puntos del ciclo celular y esto se asocia con regresión. Por otra parte, la respuesta humoral también participa con la generación de anticuerpos contra la proteína mayor de la cápside L1, los cuales tienen capacidad neutralizante y protegen de reinfección por el mismo tipo de virus y por genotipos filogenéticamente cercanos al causante de la infección inicial<sup>37</sup>. El VPH16, tiene estrategias para persistir en el sitio de la infección y para evitar la respuesta inmune innata regulando negativamente a los TLR9<sup>38</sup>, los cuales reconocen normalmente al ADN de doble cadena ajeno. Para evadir la respuesta inmune adaptativa, el VPH 16 crea un microambiente de inmunosupresión mediante regulación positiva de los genes que codifican citocinas tipo Th2 (IL-10) y Treg (TGF- $\beta$ 1), por medio de las proteínas E6/E7 de VPH16 (TGF- $\beta$ 1), y de la proteína E2 de VPHs oncogénicos que induce la expresión de IL-10<sup>5,7,39</sup>.

IL-10 reduce fuertemente la proliferación de linfocitos TCD4+ antígeno-específico<sup>40</sup>. En un estudio realizado por David G Brooks y colaboradores en 2006, en un modelo murino de infección por VPH persistente, reprodujeron lo descrito anteriormente. Los ratones presentaron niveles altos de IL-10 y una inactivación de la respuesta antiviral mediada por las células T, al deletar el gen que codifica a IL-10, se mantuvo una respuesta celular antiviral fuerte, mediada por células T, donde se eliminó rápidamente la infección y se desarrollaron células T de memoria antiviral. Al administrar anticuerpos anti-IL-10 de forma terapéutica se recuperó la respuesta de las células T<sup>41</sup>.

Otro factor que se ha asociado con el incremento de IL-10 es la presencia de especies bacterianas de los generos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* y *Streptococcus*, demostrado *in vitro* y en modelo de intestino,<sup>42</sup> a través de estudios de colonización de ratones libres de gérmenes con bacterias. En el caso específico de la vagina se ha reportado que infecciones por *C. trachomatis* predisponen a la producción de IL-10<sup>43</sup>. Lo que sugiere que la microbiota puede estar implicada en la inmunomodulación del huésped y de esta manera contribuir en la evolución o regresión del CaCU, dependiendo de su composición en cérvix.

## **Microbiota**

En 2007, con el surgimiento de tecnologías de secuenciación masiva de ADN, se empezó el proyecto del microbioma humano, el cual tiene por objetivo determinar los microorganismos presentes en el organismo humano y su función. El ser humano contiene más bacterias que el número de células que lo componen, se estiman que viven alrededor de 100 trillones de microorganismos que han co-evolucionado con él<sup>44</sup>. La colonización por microorganismos simbióticos de sitios anatómicos como intestino, piel, naso-orofaringe y tracto genito-urinario es lo que define a la microbiota y ésta depende de factores ambientales como el pH, la temperatura, el oxígeno, la osmolaridad, en algunos casos del peristaltismo, la secreción de lisozimas y la tolerancia del sistema inmune a ellas (secreción de IgA)<sup>45</sup>.

La estructura de la microbiota cambia con el tiempo debido a factores genéticos, situaciones de estrés, nutrición, sexo, edad y dieta. Los genes de la microbiota es lo que conforma el microbioma y en conjunto son más que los genes eucariotas que constituyen el cuerpo humano. La microbiota ha permitido al ser humano adquirir funciones que no posee por sí mismo, como: la producción de biotina y vitamina B, esenciales para el metabolismo humano; participación en el reciclaje de urea y sales biliares<sup>46</sup>; fenómeno de interferencia bacteriana, en el cual las bacterias que componen

a la microbiota compiten por nutrientes y espacio en las áreas anatómicas donde el sistema inmune les permite vivir y crean un ambiente desfavorable para los patógenos; finalmente, activan y moldean al sistema inmune<sup>47</sup>.

El desequilibrio de la microbiota se conoce como disbiosis y se caracteriza por el cambio de la composición de las comunidades bacterianas. Cuando se presenta disbiosis en la vagina se le llama vaginosis bacteriana (VB), la cual clínicamente se mide con la escala de Nugent (Nugent score), y se manifiesta por un aumento en la diversidad de la microbiota, prurito, aumento en el pH de la vagina y descarga vaginal con un olor característico a pescado. En la VB, se favorece el predominio de la flora cocobacilar Gram negativa, donde prevalecen los grupos anaerobios *Gardnerella spp*, *Mobiluncus spp*, *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp*, *Parvimonas spp*, *Peptoniphylus spp* y *Sneathia spp*<sup>48</sup>. Otro estudio sobre diversidad de la microbiota vaginal asociada a vaginosis bacteriana reportó tres phyla (Bacteroidetes, Actinobacteria y Fusobacteria) y ocho géneros que incluyen *Gardnerella*, *Atopobium*, *Megasphaera*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Leptotrichia/Sneathia*, *Prevotella* y *Papillibacter*, fuertemente asociados con VB<sup>49</sup>.

La microbiota vaginal ha sido más estudiada que la del cérvix; por su proximidad anatómica y características físicas similares, es plausible asumir que podría tener una composición similar la microbiota del cérvix, pero con menor diversidad. En vagina se ha descrito la microbiota de mujeres sanas<sup>50,51,52,53</sup>, con VB<sup>49</sup>, con VIH<sup>54</sup>, con infección por VPH sin lesión en cérvix<sup>55</sup> y *Trichomonas spp*<sup>56</sup> como se indica en el cuadro 1.

Referencia	Población de estudio	Objetivos del estudio	Objetivo	Resultados
Xia Zhou et al. Microbiology 2004, 150:2565–2573	cinco mujeres caucásicas 28-44 años	Describir la microbiota vaginal de mujeres blancas, mediante el uso de un método independiente de cultivos (secuenciación).		En cuatro mujeres predominaron especies de Lactobacilos:  En dos grupos de mujeres predominó <i>L. iners</i> y <i>L. crispatus</i> En una mujer predominó <i>Atopobium spp.</i> y en otra <i>Megasphaera spp.</i> y <i>Leptotrichia spp.</i>
Xia Zhou et al. The ISME Journal 2007, (1):121–133	144 mujeres sanas caucásicas y afroamericanas de los siguientes intervalos de edad 13-18, 19-35 y 36-40 años	Describir la microbiota vaginal de mujeres caucásicas y afroamericanas para ver si existen diferencias entre las etnias		Ocho super grupos El 33% de Afroamericanas tenía un supergrupo donde no predominaron Lactobacilos vs 7% en caucásicas Grupos donde predominaron de igual manera Lactobacilos de distintas especies, más común en caucásicas
Jaques Ravel et al. PNAS, 2011, 08(1): 468	396 mujeres sanas caucásicas, afroamericanas, hispanas y asiáticas	-Establecer si hay correlación entre las comunidades microbianas (CM) y el pH vaginal - Explorar como la composición de las CM se refleja en el Nugent score -Identificar patrones en la abundancia relativa de las especies microbianas a nivel vaginal		- Cinco supergrupos - Ph vaginal por etnia: hispanas 5.0±0.59; afroamericanas 4.7±1.04; asiáticas 4.4±0.59; y blancas 4.2±0.3 - No se encontraron relaciones significativas entre la edad, etnia y tipo de comunidad. - La presencia de Lactobacilos correlacionaron con una escala de Nugent menor - La presencia de <i>Aerococcus</i> , <i>Anaeroglobus</i> , <i>Anaerotruncus</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Coriobacteriaceae_2</i> , <i>Dialister</i> , <i>Eggerthella</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Gemella</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Parvimonas</i> , <i>Peptoiphilus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyomonas</i> , <i>Prevotellaceae_1</i> , <i>Prevotellaceae_2</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , y <i>Snethia</i> correlacionó con una escala de <i>nugent mayor</i>
Pawel Gajer et al. Sci Transl Med 2012, 432ra52	32 mujeres en edad reproductiva sanas, sin o con vaginosis bacteriana	Describir la dinámica temporal de la composición de la microbiota vaginal		-La microbiota a través del tiempo es dinámica - La fluctuación entre la composición y permanencia de las comunidades bacterianas son afectadas principalmente por el ciclo menstrual, la clase de comunidad bacteriana y en cierto grado a la actividad sexual
Benjamin C. Smith et al. PLoS ONE, 2012, 7(7):e40425	10 mujeres jóvenes con inicio reciente de vida sexual activa	Comparar métodos de secuenciación y bases de datos para el análisis de secuencias bacterianas -Describir la microbiota y sus diferencias en el tiempo intra e inter individuos		- La microbiota del cérvix cambia de composición con el tiempo. - Las bases de datos Usearch y pplacer son consistentes en las clasificaciones para los tres métodos de secuenciación, mientras que RDP se desvía significativamente cuando se caracterizan lecturas de Illumina.

**Cuadro 1 Comparación objetivos y resultados de estudios de microbiota vaginal y cérvix**

La microbiota vaginal, que se ha asociado a mujeres aparentemente sanas, es decir, que son asintomáticas, ha sido estudiada por distintos autores<sup>50,51,52,53</sup>. En el estudio realizado por Ravel *et al*<sup>51</sup>, en mujeres sanas de etnias distintas se identificaron cinco grupos de comunidades bacterianas en las que predominaron: en el grupo I *L. crispatus*, grupo II *L. gasseri*, grupo III *L. iners*, grupo IV con mayor diversidad donde predominó mayormente *Prevotella spp*, *Megaesphaera spp* y *Atopobium spp* y grupo V donde predominó *L. jensenii*. Se identificaron 282 taxas en total, en el super grupo I, se ubicaron muestras de 105 mujeres, en el grupo II-25 mujeres, grupo III-135 mujeres, en el grupo IV-108 mujeres, y en el grupo V-21 mujeres. A continuación se presenta la distribución de las comunidades microbianas a nivel vaginal por etnia, reportadas por Ravel *et al.* (Figura 6). En este mismo estudio llegaron al resultado de que el pH vaginal es distinto de acuerdo a la etnia: las hispanas presentan un nivel de pH de  $5.0 \pm 0.59$ , la población negra un pH de  $4.7 \pm 1.04$ , la población asiática un pH de  $4.4 \pm 0.59$  y las caucásicas un pH de  $4.2 \pm 0.3$ . Las etnias que presentan un pH más alto a nivel vaginal (mujeres hispanas y afroamericanas), presentan una diversidad bacteriana mayor, con una representación importante de bacterias del grupo IV. Al correlacionar los filotipos bacterianos con la abundancia relativa de todos los tipos de comunidades y con los puntajes de Nugent, 60 especies (todos *Lactobacillus*) correlacionaron negativamente con la calificación de Nugent y las demás especies correlacionaron positivamente. Lo que indica una correlación positiva entre una diversidad bacteriana mayor con un score de Nugent mayor y por lo tanto vaginosis bacteriana. El grupo menos representado a nivel vaginal corresponde a la microbiota cocobacilar Gram negativa. De acuerdo a Ravel *et al.*, no existen relaciones significativas entre la edad, etnia y tipo de comunidad bacteriana<sup>51</sup>.

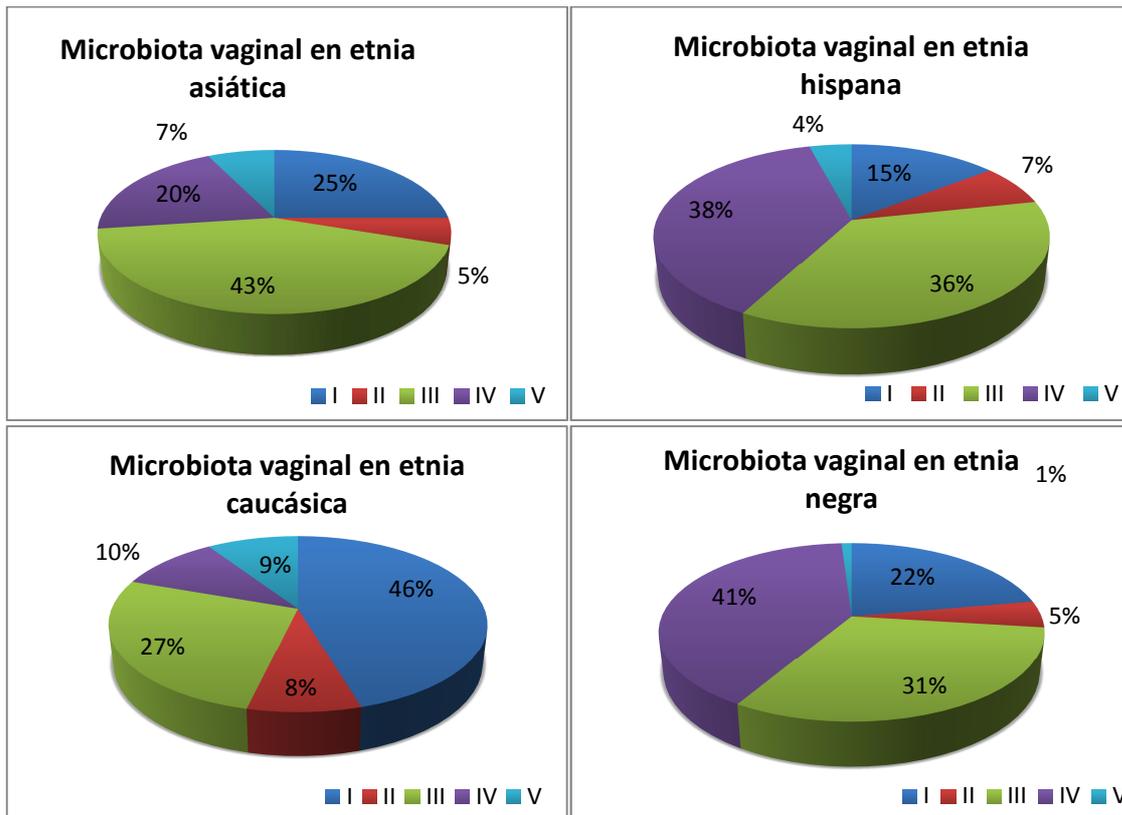


Figura 6. Representación gráfica de los resultados obtenidos por Ravel et al, en el estudio "Vaginal microbiome of reproductive -agewomen" publicado en 2011. El grupo I representa comunidades microbianas predominadas por *L.crispatus*, el grupo II por *L.gasseri*, el grupo III por *L. iners*, el grupo IV por especies de *Lactobacillus* y el grupo V por *L. jensenii*<sup>51</sup>.

Hasta el momento sólo se han publicado dos estudios de la microbiota del cérvix; uno corresponde a un estudio longitudinal en una cohorte de mujeres sanas en Guanacaste Costa Rica, que se realizó con el propósito de comparar tres plataformas de secuenciación distintas Sanger, 454 de Roche e Illumina; y tres tipos de algoritmos distintos (RDP classifier, Usearch y pplacer) para hacer la clasificación de los microorganismos de acuerdo a la secuencia del gene que codifica el ARNr 16S. En este estudio se describieron seis grupos de comunidades bacterianas, cuatro en los que predominaron especies de *Lactobacillus*: *L. inners*, *L. crispatus*, *L. gaseri*, uno en el que predominó *Gardnerella vaginalis*, otro en el que hubo una proporción igual de *G. vaginalis* y *Lactobacillus spp* y uno en donde hubo una diversidad mayor de bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Sneathia*, *Megasphaera*, *Streptococcus* y

*Atopobium*) en mujeres que habían iniciado recientemente su actividad sexual. Además, se comprobó que la microbiota del cérvix cambia de composición con el tiempo. RDP identificó géneros que Usearch y pplacer no detectó, por ejemplo *Shuttleworthia* y *Howardella*. Los análisis generados con Usearch y pplacer son consistentes con las clasificaciones para los tres métodos de secuenciación, mientras que RDP se desvía significativamente cuando se analizan lecturas de Illumina. Se reportó que el método de amplificación y secuenciación afecta más a la caracterización del microbioma que los algoritmos de clasificación<sup>52</sup>.

El otro estudio fue realizado en mujeres embarazadas chinas, donde el grupo control fueron cinco mujeres sin embarazo. El objetivo fue comparar la composición de la microbiota de tres sitios anatómicos (cérvix, fornix posterior y la vagina) y su variación en los distintos trimestres del embarazo. Los hallazgos del estudio fueron que la variación de la microbiota entre sitios anatómicos fue mínima, pero la composición de la microbiota en las mujeres postpartum es distinta de la de mujeres embarazadas, los tipos de comunidades bacterianas que identificaron fueron similares a los reportados por Ravel J.<sup>57</sup>

Se realizó un estudio de microbiota vaginal en mujeres coreanas, donde el grupo control fueron mujeres sin lesión VPH negativas (n=26), los grupos de casos fueron mujeres sin lesión VPH positivas (n=19) o con lesiones premalignas en cérvix (n=5), de entre las cuales, decidieron comparar la microbiota de 9 pares de gemelas que se diferenciaban entre sí por su estatus de infección por VPH sin lesión (n=18). Los autores reportaron que las mujeres postmenopáusicas (parientes de las participantes) tienen una microbiota con menor cantidad de *Lactobacillus* y más diversa que la de mujeres premenopáusicas; también reportaron que la microbiota de las gemelas se parecía más entre sí que a la de mujeres no relacionadas; en la comparación de la microbiota de mujeres sin lesión VPH positivas vs sin lesión VPH negativas, se relacionaron con la infección: una disminución en la proporción de *Lactobacillus iners*, mayores proporciones de *Prevotella*, *Sneathia*, *Megasphaera*, *Dialister*, y *Bacillus* y presencia de *Fusobacterias*.<sup>58</sup>

## Interacciones entre la microbiota & sistema inmune

No existen estudios hasta el momento donde se evalúen las interacciones entre la microbiota y el sistema inmune a nivel del cérvix, pero en otros modelos tanto en vagina<sup>10</sup> como en intestino<sup>59,47</sup>, se ha descrito que las bacterias pueden ejercer de manera especie específica una presión selectiva sobre el tipo de respuesta inmune. En intestino, el modelo más estudiado, se ha descrito cómo la microbiota ha co-evolucionado con el ser humano y cómo mantiene interacciones, en las que el sistema inmune regula a la microbiota y la microbiota moldea y madura al sistema inmune. Por un lado, el sistema inmune mantiene en control a la microbiota, por medio de su estratificación, compartimentación (mediante barreras de moco) que mantienen a la microbiota separada del epitelio intestinal. Cuando la microbiota se ubica en la capa interna de moco en el intestino, las células dendríticas fagocitan a las bacterias y viajan al ganglio linfático mesentérico para presentar los antígenos bacterianos a los linfocitos T, que a su vez activarán a las células B que segregarán IgA para eliminar el riesgo de que pase la microbiota al intestino. La inmunidad innata, por medio de distintos agentes microbianos como las defensinas, seleccionan a las bacterias que residen en el lumen. Por otro lado, la microbiota moldea al sistema inmune, por ejemplo, los folículos linfoides del intestino no se desarrollan en ratones libres de gérmenes. Así mismo, se ejerce presión selectiva sobre un subconjunto de células T. Las bacterias filamentosas segmentadas promueven la acumulación de células Th17 y en menor grado las Th1, géneros de la familia *Clostridium*, y polisacárido A incrementan los Treg que producen TGF- $\beta$ 1 e IL-10<sup>51</sup>. Por lo tanto, la microbiota es un factor importante a tomar en cuenta para estudiar el fenómeno de salud-enfermedad.

Para estudiar el efecto de la microbiota en vagina, Doerflinger *et al.*, colonizaron *in vitro* células epiteliales 3D que simulan el epitelio vaginal, con dos tipos de *Lactobacillus L. iners* y *L. crispatus*, y con dos bacterias relacionadas a VB *A. vaginae* y *Prevotella bivia*<sup>10</sup>. La infección con *A. vaginae* provocó una respuesta pro-inflamatoria robusta con expresiones altas de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  que puede afectar la función de barrera del epitelio. *L. iners* indujo patrones de reconocimiento pero no cambió la expresión de

la mucina o secreción de IL-6 e IL-8. *P. bivia* indujo activación baja de las células epiteliales y presentó un cambio en el péptido antimicrobiano, lo que puede afectar la función de barrera del epitelio. Al infectar con *L. crispatus*, las células epiteliales tuvieron una activación baja y hubo una interrupción mínima de su función de barrera lo que confirmaría su clasificación como bacteria benéfica<sup>10</sup>.

## Métodos para el estudio de la microbiota

Se han utilizado distintas metodologías para definir la microbiota, la primera y más antigua es basada en la identificación de colonias en medios de cultivo, pruebas bioquímicas y su observación al microscopio con tinción de Gram. Con los avances de la biotecnología, se han desarrollado métodos moleculares para su estudio, como PCR en tiempo real (qPCR), T-RFLP, FISH, microarreglos con sondas para el ARNr 16S, clonación del ARNr 16S<sup>60</sup>, secuenciación masiva en paralelo de ARNr 16S o Cpn60<sup>54</sup> y secuenciación tipo shotgun. De estos métodos solo los últimos cinco tienen resolución filogenética, las ventajas y desventajas de cada método pueden ser consultadas en el cuadro 2.

Método de estudio	Ventajas	Desventajas
Cutivo	Bajo costo, semicuantitativo	Laborioso, las bacterias que no son cultivables no pueden ser captadas
qPCR	Identificación filogenética, cuantitativa y rápida	Sesgo de PCR, no se pueden identificar especies desconocidas.
T-RFLP	Rápido, semicuantitativo, barato	No permite identificación filogenética, sesgo PCR y baja resolución.
FISH	Identificación filogenética, semi-cuantitativa, no tiene sesgo por PCR	Depende de las secuencias de las sondas y no se pueden identificar especies desconocidas.
Microarreglos ADN	Identificación filogenética, semi-cuantitativa y rápida	Hibridación cruzada, sesgo PCR, difícil de detectar las especies presentes en baja concentración.
Clonación ARNr 16S	Identificación filogenética, cuantitativa	Laboriosa, sesgo PCR, costosa, sesgo de clonación.
Secuenciación masiva ARNr 16S amplicones	Identificación filogenética, cuantitativa, rápida permite identificar especies nuevas	Sesgo PCR, laboriosa y cara
Secuenciación shotgun	Identificación filogenética cuantitativa	Cara, análisis informático intenso

**Cuadro 2 Métodos de estudio de microbiota**

Dentro de la filogenética, se asume que las mutaciones en las secuencias de ADN homólogas se producen al azar y aumentan con el tiempo de manera lineal; de modo que las diferencias entre ellas reflejan la distancia evolutiva entre las dos especies comparadas. En la actualidad, este principio es en el que se basan para la clasificación y establecimiento de relaciones filogenéticas, que permiten el estudio de la evolución de las especies. En taxonomía, cepas que comparten una identidad del 70% o más en experimentos de reasociación ADN-ADN, son consideradas de la misma especie bacteriana. De igual forma, cepas de la misma especie por lo general presentan una identidad del 97% o más entre su ARN ribosómico (ARNr) 16S<sup>61</sup>.

El gen que codifica al ARNr 16S puede considerarse como la secuencia más utilizada en estudios filogenéticos, porque su estructura y función son altamente conservadas en todas las especies procariotas. El ARNr 16S forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma 30S, y el gen codificante contiene aproximadamente 1500 pares de bases (pb), con ocho regiones altamente conservadas que son enmarcadas por nueve regiones variables. Dicha estructura permite identificar dependiendo de región variable el género y a veces la especie de las bacterias de acuerdo a su secuencia, ya que se considera que no hay transferencia horizontal de estos genes y por lo tanto se considera que tienen una evolución lenta. Después de demostrar que se pueden obtener resultados altamente similares de clasificación al secuenciar solo fragmentos del gen conteniendo regiones variables vs el gen completo, se han diseñado varios cebadores, que hibridizan en regiones conservadas distintas, para amplificar las secuencias variables intermedias, secuenciarlas y caracterizar comunidades bacterianas<sup>62</sup>.

Existen dos tipos de diversidad que describen la microbiota, alfa y beta. La diversidad alfa describe solo la riqueza de un sitio definido o muestra. Para cuantificarla se usan parámetros que describen la uniformidad de la comunidad bacteriana, como el índice de entropía de Shannon que toma en consideración el número de especies que componen la comunidad y su abundancia relativa, y el índice de diversidad filogenética (*del inglés* PD whole tree), que toma en consideración la longitud de las ramas de la

filogenia de cada muestra. Esta medida usa patrones filogenéticos de la diversificación evolutiva para predecir la diversidad de un set de especies, por lo que toma en cuenta la composición<sup>63</sup>. La diversidad  $\beta$  compara las similitudes y diferencias entre comunidades bacterianas en estados distintos como salud-enfermedad.<sup>64</sup>

## **Justificación**

El CaCU ocupa el segundo lugar en mortalidad por neoplasia en mujeres mexicanas, por lo que sigue siendo un problema de salud pública. Lo que justifica la investigación de los factores que pueden estar asociados al desarrollo de la enfermedad, la cual es relevante para su prevención, el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y esquemas de tratamiento.

Uno de los factores involucrados en el desarrollo del CaCU, adicionalmente a la infección por VPH-AR, es la inmunosupresión del cérvix caracterizada por un nivel alto de citocinas tipo Th2 (IL-10, IL-4, IL-6) y Th3 (TGF- $\beta$ 1), esto le permite al virus evadir al sistema inmune, persistir y evolucionar a CaCU. Otros factores de riesgo asociados son: las coinfecciones con vaginosis bacteriana (VB)<sup>55</sup>, infección por Herpes, VIH y *C. trachomatis*, ésta última a su vez ha sido asociada a la persistencia de IL-10 en el tracto genitourinario bajo<sup>43</sup>, que incluye cérvix y vagina. También se ha descrito que otras especies específicas de bacterias como *Atopobium vaginae* ejerce una presión selectiva sobre el perfil de citocinas y promueve la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-8 y TNF $\alpha$ <sup>10</sup>. Lo que sugiere que la microbiota podría estar participando en la inmunomodulación del microambiente tumoral.

Este estudio permitió elucidar si existe asociación entre la diversidad y composición de la microbiota del cérvix y los estadios de la enfermedad, y si ésta a su vez se asocia con un perfil de expresión de citocinas específico.

## **Objetivos**

### **Objetivo general:**

Evaluar la asociación de la diversidad y composición de la microbiota del cérvix con el nivel de expresión de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , en el cérvix de mujeres en los distintos estadios del CaCU (sin lesión en cuello uterino VPH negativas y positivas, con lesiones escamosas intraepiteliales y con cáncer cervicouterino).

### **Objetivos específicos:**

1. Identificar la microbiota del cérvix en muestras de mujeres sin lesión en cérvix VPH negativas y positivas, mujeres con lesiones premalignas, y con cáncer cervicouterino.
2. Evaluar el nivel de expresión de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  a nivel del cérvix de cada estadio de la historia natural del CaCU.
3. Determinar la asociación entre la diversidad (índice de entropía de Shannon) y/o composición (índice PD whole tree) de la microbiota del cérvix, con infección por VPH, lesión premaligna en cérvix y cáncer cervicouterino.
4. Evaluar la diferencia de los niveles de expresión de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  a nivel del cérvix, por cada tipo de comunidad bacteriana identificada.
5. Investigar si existe correlación entre los índices de diversidad de la microbiota con el nivel de expresión de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  a nivel de cérvix y el diagnóstico histopatológico.

## Material y Métodos

### Hipótesis

La diversidad de la microbiota en estadios avanzados del CaCU es mayor que la encontrada en mujeres sin lesión de cérvix VPH+ y VPH-.

Existen especies bacterianas asociadas a cada estadio del cáncer cervicouterino.

Los niveles de expresión de las citocinas Th2 (IL-4, IL-10) y Th3 (TGF- $\beta$ 1) a nivel del cérvix son mayores en CaCU en comparación con los encontrados en mujeres sin lesión de cérvix VPH+ y VPH-.

Existe una diferencia significativa en los niveles de expresión de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  a nivel del cérvix, al evaluarlo por comunidad bacteriana identificada.

### Diseño del estudio

Para contestar la pregunta de investigación: **¿Existen diferencias entre la diversidad y composición de la microbiota y el perfil de citocinas del cérvix de mujeres sin lesión VPH negativo y positivo, con lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado y con CaCU?** Se realizó un estudio con diseño transversal, con un fin exploratorio por tratarse del primer acercamiento al estudio del microbioma de cérvix que se realiza en nuestro laboratorio y ya que no existen antecedentes de estudios con los mismos objetivos.

### Población de estudio

El estudio está anidado al proyecto madre "Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical", el cual fue aprobado por los comités de investigación, ética en investigación y bioseguridad del

Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). En el cual, se creó un banco de 676 muestras de ADN y ARN extraído de exudados de cérvix de mujeres sin lesión en cérvix y de biopsias de cérvix de mujeres con lesión premaligna en cérvix, que asistieron a consulta ginecológica de junio del 2008 a noviembre del 2010 al Centro de Atención para la Salud de la Mujer (CAPASAM), y de biopsias de cérvix de mujeres con CaCU que asistieron a consulta ginecológica de septiembre de 2010 a noviembre de 2011 al Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Se obtuvo el consentimiento informado de todas las participantes que formaron parte del estudio, en el cual dieron su autorización para el uso de sus muestras en otros proyectos de investigación (Anexo 1-consentimiento informado proyecto madre al que esta anidado este estudio). La toma de las muestras se realizó dos semanas después del retiro de su periodo menstrual.

Los criterios de inclusión del proyecto madre fueron: cumplir con la mayoría de edad, tener su consentimiento informado y firmado, contar con el diagnóstico citológico, colposcópico e histopatológico para LEIBG o LEIAG y CaCU, y citológico sin alteraciones histopatológicas en cérvix para los controles sin lesión en cérvix (VPH negativo y positivo), cuestionario completo y resultado de tipificación de VPH.

Los criterios de exclusión del proyecto madre fueron: padecer de una enfermedad autoinmune o con cuadro inflamatorio, y tener una coinfección de transmisión sexual.

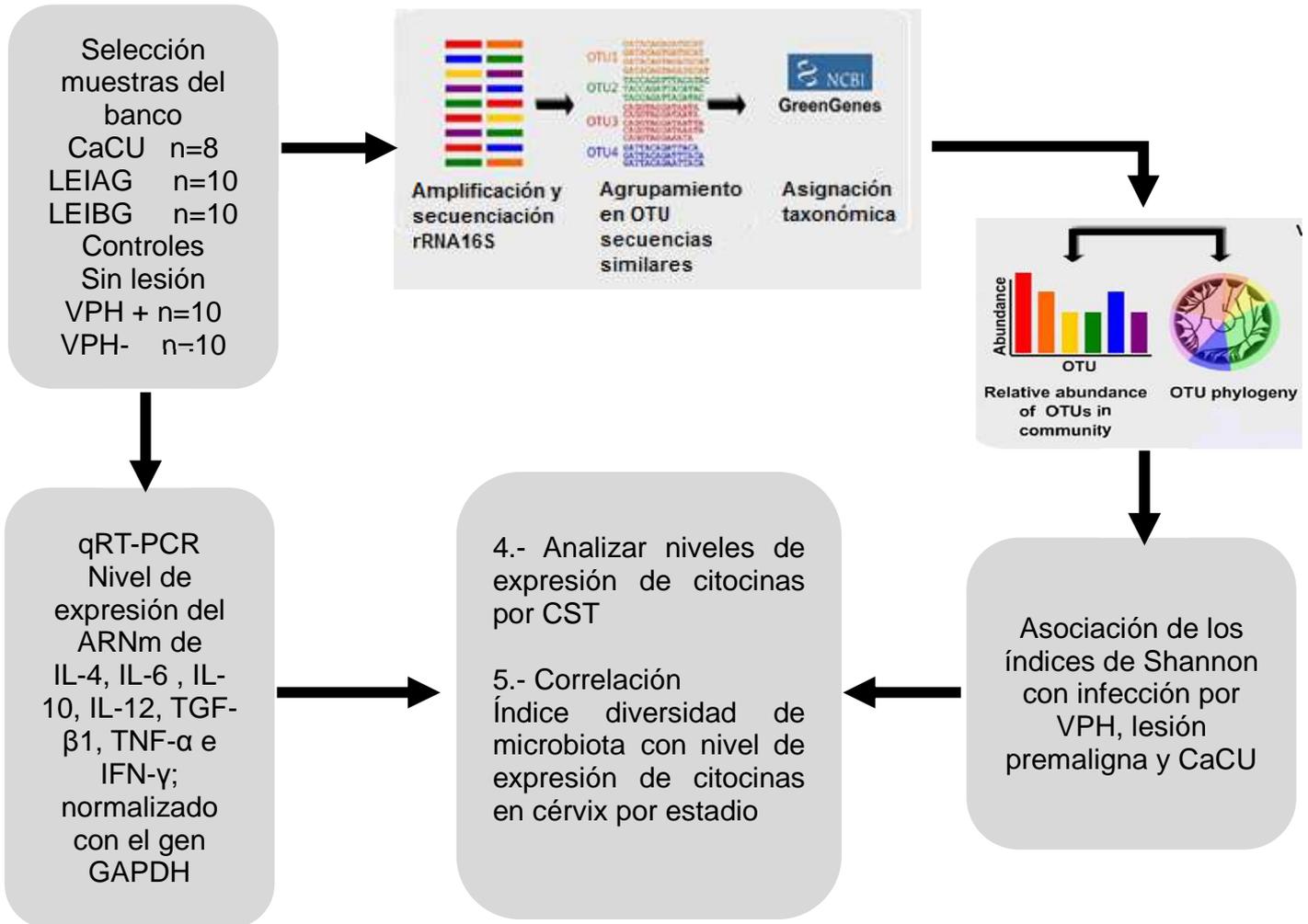
Para este estudio, los criterios de inclusión relacionados a la historia clínica para la selección de muestras del banco de ácidos nucleicos fueron: no tener registro de consumo de antibióticos o antimicóticos en los últimos 30 días antes de la toma de la muestra, contar con diagnóstico de tipificación molecular de VPH y contar con la pureza e integridad adecuadas de ADN para realizar la secuenciación y cuantificación de ARNm por qRT-PCR. El único criterio de exclusión por muestra, fue no contar con un número adecuado de lecturas para el análisis bioinformático.

Por conveniencia metodológica, se fijó una n de 48 pacientes, ya que el costo de las corridas de secuenciación masiva, con la plataforma 454 Roche, es muy elevado y el presupuesto limitado, no fue posible realizar la secuenciación de un número mayor de muestras.

Adicionalmente, el volumen de datos a analizar es muy grande (se generan alrededor de 700,000 lecturas por corrida de acuerdo a las especificaciones del proveedor<sup>65</sup>). Así, del banco biológico se eligieron 10 muestras por grupo y ocho para CaCU. Se tomaron como grupo control a las mujeres sin lesión en cérvix VPH negativas y positivas, y como casos las muestras con lesión premaligna y CaCU. Por cada estadio de la enfermedad se analizaron 10 u 8 pacientes que se parearon por edad 1:2 con los controles.

Por medio del programa STATA v12 se calculó el poder para una proporción de dos poblaciones, para un relación 1:2 caso-control, 10 u 8 casos por estadio de lesión o CaCU y 20 controles sin lesión en cérvix. Con la n fija anteriormente, una proporción de diversidad cercana a 0.8 en los casos y de 0.2 para los controles, con base a un artículo de microbiota de vagina<sup>51</sup>, se obtuvo un poder de 0.9997.

## Estrategia metodológica



## **Metodología para objetivo 1**

Para cumplir con el primer objetivo específico: Identificar la microbiota del cérvix en muestras de mujeres sin lesión en cérvix VPH negativas y positivas, mujeres con lesiones premalignas, y con cáncer cervicouterino.

### **Selección de muestras y secuenciación**

Se buscó dentro de la base de datos del banco de ácidos nucleicos las muestras que cumplieran los criterios de inclusión para este estudio, se organizaron por etapa de la enfermedad (Mujeres sin lesión VPH negativas, sin lesión VPH positivas, LEIBG, LEIAG, CaCU), de donde se eligieron aleatoriamente 15 muestras por grupo considerando que podría haber muestras que no amplificaran. Se amplificó, mediante PCR punto final, la secuencia blanco del gen que codifica al 16S ARNr (regiones V3 – V4) y se visualizó el amplicón en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. De las muestras que amplificaron se seleccionaron aleatoriamente 10 por cada grupo. Contando con presupuesto para una sola corrida de 454 Roche, y considerando la profundidad de secuenciación recomendada, reportada por Goodrich et al. 2014<sup>66</sup>, se eligieron 48 muestras para obtener una profundidad de secuenciación por muestra adecuada.

El gen que codifica al ARNr 16S se encuentra muy conservado en todas las bacterias; sin embargo, su secuencia cuenta con regiones variables que permiten distinguir entre especies de bacterias, por lo que se considera el estándar de oro para determinar la taxonomía bacteriana por métodos cultivo independientes<sup>67</sup>. Para preparar las genotecas de ADN se obtuvo un amplicon de ~456pb de las regiones variables V3-V4, usando los oligonucleótidos 347F 5'- GGAGGCAGCAGTRRGAAT-3' y **803R** 5'- CTACCRGGGTATCTAATCC-3'<sup>68</sup> con las condiciones de reacción descritas en el cuadro 3 y el programa de amplificación descrito en el cuadro 4.

**Cuadro 1. Condiciones de reacción PCR para el gen 16S rRNA, regiones variables V3-V4**

<b>Condiciones de reacción PCR</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>[reactivo]</b>	<b>[ final]</b>	<b>Volumen por reacción 30µl</b>
Buffer	10X	1X	3µL
Cebador 347F	420pmol/µL	5pmol/µL	0.4µL
Cebador 803R	500pmol/µL	5pmol/µL	0.3µL
dNTP's	25mM	1mM	1.2µL
MgSO <sub>4</sub>	50mM	2.5mM	1.5µL
Taq	5 U/µL	0.2 U/µL	1.2µL
Agua			21.4 µL
ADN	Variable	50ng	1µL

**Cuadro 2. Condiciones de amplificación**

<b>Programa PCR V3-V4 16SrADN</b>		
<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización	94 °C	3min
<b>30 ciclos</b>		
Desnaturalización	94 °C	30seg
Alineación	55 °C	30 seg
Extensión	68 °C	30 seg
Extensión final	68 °C	5min

Los 48 productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, fueron purificados y extraídos del gel con el Kit MiniElute de Qiagen. Los amplicones se agruparon en ocho genotecas, cada una con seis muestras y posteriormente se reamplificaron con los cebadores listados en el cuadro 5 de acuerdo a la matriz siguiente.

**Cuadro 3. Matriz de las muestras que compusieron a las ocho genotecas y secuencia de los MIDs**

MID	1	2	3	4	5	6	7	8
1	26C	163C	195C	214C	259C	334G	4C	128C
2	251c	137c	219C	220C	237C	240C	255C	256C
3	257C	260C	1C	230c	91C	238G	247G	349G
4	363G	322G	361G	359G	263G	241G	258G	337G
5	342G	351G	352G	354G	356G	338G	374G	257G
6	90	92	32	93	100	56	85	152

**Oligonucleótidos Forward (5' → 3') con adaptador A para librerías tipo Lib-L**

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGXXXXXGGAGGCAGCAGTRRGAAT

MID1 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTATGGAGGCAGCAGTRRGAAT  
MID2 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGGTGGAGGCAGCAGTRRGAAT  
MID3 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTCATGGAGGCAGCAGTRRGAAT  
MID4 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACTAGGAGGCAGCAGTRRGAAT  
MID 5 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGATCTGGAGGCAGCAGTRRGAAT  
MID 6 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGATCAGGAGGCAGCAGTRRGAAT

**Oligonucleótidos Rev (5' → 3') con adaptador B para librerías tipo Lib-L**

16sR CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCTACCRGGTATCTAATCC

Los cebadores sentido, además del adaptador A, contienen una secuencia identificadora de 6 nucleótidos (MID) que mantiene la identidad de la muestra. Mientras que el cebador reverso fue el mismo para todas las reacciones y contiene el adaptador B. Estos cebadores fueron diseñados en el laboratorio y están basados en la secuencia descrita en el artículo descrito por Nossa y colaboradores (2010)<sup>68</sup>.

Las condiciones de reacción para los PCRs de re-amplificación se describen en el cuadro 6, y la mezcla de reacción se realizó de acuerdo al cuadro 3. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1.5%, y los fragmentos de ADN fueron extraídos del gel. La concentración de los fragmentos amplificados se analizó por electroforesis capilar en el equipo BioAnalyzer 2100, empleando el estuche High Sensitivity DNA kit de Agilent Technologies. Los seis productos amplificados y purificados de cada genoteca, fueron mezclados de manera equimolar para obtener una composición aproximada de 100 ng/μL. Posteriormente, las 8 genotecas se purificaron con Ampurebeads de Beckman para remover trazas de ADN de bajo peso. En seguida se realizó la titulación de la PCR de emulsión y el cálculo del rendimiento

para determinar el volumen de perlas de reacción a agregar a las placas del secuenciador. La concentración e integridad de las genotecas se analizó por electroforesis capilar en el equipo BioAnalyzer 2100, empleando el estuche High Sensitivity DNA kit de Agilent Technologies.

**Cuadro 4. Condiciones de reacción para la re-amplificación con adaptadores**

<b>Mezcla de reacción de PCR</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>[reactivo]</b>	<b>[ final]</b>	<b>Volumen por reacción 30µl</b>
Buffer	10X	1X	3µL
Cebador 16sFMx	420pmol/µL	5pmol/µL	0.4µL
Cebador 803R adaptador B	500pmol/µL	5pmol/µL	0.3µL
dNTP's	25mM	1mM	1.2µL
MgSO <sub>4</sub>	50mM	2.5mM	1.5µL
Taq	5 U/µL	0.2 U/µL	1.2µL
Agua			21.4 µL
ADN	Variable	0.0625ng/µL	1µL

Posteriormente, las 8 genotecas se secuenciaron masivamente en un placa dividida en 8 regiones en la plataforma Genome Sequencer Titanium de Roche, Applied Science<sup>69</sup>.

### **Análisis bioinformático**

Las secuencias crudas fueron procesadas para amplicón con el software complementario del equipo de secuenciación masiva 454 Roche (Roche, Applied Science). Los archivos .sff (formato de Roche), fueron convertidos a archivos .fasta y .qual. Se descartaron las secuencias de longitudes menores a 200pb y mayores a 1000pb y se seleccionaron las secuencias de alta calidad con base al siguiente criterio: las lecturas que tuvieran cinco bases consecutivas con un valor menor de 20 en la escala de Phred (escala logarítmica que representa la probabilidad de que la asignación de un nucleótido haya sido errónea, donde un valor de 20 corresponde a una probabilidad de 1 en 100 de que haya sido así), en una ventana móvil de 30 pares de bases fueron descartadas. Se supervisó la calidad de las secuencias con el script de R de Thomas Girke's R script fastqQuality<sup>70</sup>.

En QIIME<sup>71</sup>, a partir de los archivos .fasta, se realizó el dimultiplex para identificar las secuencias que pertenecían a cada muestra de acuerdo a su identificador molecular (MID). Se analizó la distribución de las secuencias generadas en la corrida a través de las muestras. Las muestras que tuvieron baja profundidad de secuenciación, menos de mil lecturas<sup>72</sup>, fueron descartadas del estudio. Se agruparon las secuencias en unidades operacionales taxonómicas (OTUs) por medio del alineamiento de las secuencias con el algoritmo PyNAST<sup>73</sup>, todas las secuencias que entre ellas tuvieron un 99% o más de similitud, se consideraron un mismo OTU. De cada OTU se eligió una secuencia representativa para su posterior identificación taxonómica. Se asignaron taxas con el algoritmo Uclust, usando como referencia la base de datos Green Genes publicada en agosto del 2013 (versión pública más reciente gg\_13\_05)<sup>74</sup>, de manera que toda secuencia representativa alineada con una identidad de 99% a una secuencia en la referencia, se le asignó la taxonomía de la especie registrada en la base de datos. Posteriormente se hizo la relación de qué secuencias conformaron cada OTU y se generó la tabla de frecuencias (extensión .biom) para ver la abundancia relativa de las distintas especies por muestra y grupo, para los análisis de diversidad  $\alpha$  y  $\beta$ .

Para comparar la composición de las comunidades bacterianas presentes en cada una de las muestras, se realizó el cálculo de la disimilitud de Bray Curtis. Se visualizó esta disimilitud a través de un mapa de calor no supervisado, por agrupamiento jerárquico promedio, a partir del cual se identificaron los grupos de comunidades bacterianas a los cuales se denominaron CST (por sus siglas en inglés community state type).

Para estudiar la diversidad alfa, dentro de cada muestra, se calculó el índice de Shannon de las muestras por grupo y se visualizó en curvas de rarefacción. El índice de Shannon comprende la riqueza, número total de especies, y su abundancia relativa de acuerdo a la ecuación siguiente, donde S es el número de especies, pi la proporción de cada especie dentro de la muestra y H' el índice de entropía de Shannon.

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i$$

También se utilizó el índice de diversidad filogenética PD whole tree para el estudio de la diversidad alfa, que toma en consideración la longitud de las ramas de la filogenia de cada muestra. Esta medida usa patrones filogenéticos de la diversificación evolutiva para predecir la diversidad de un set de especies, por lo que toma en cuenta la composición<sup>75</sup>.

La diversidad  $\beta$  se calculó con base en la distancia filogenética entre cada par de muestras medida con el método UniFrac<sup>76</sup>. Todas las taxas identificadas en cada muestra, se incluyeron en un árbol filogenético y se contabilizaron las ramas compartidas y las no compartidas para calcular la distancia de la siguiente manera:

$$\text{distancia entre muestras} = \frac{\sum \text{ramas no compartidas}}{\sum \text{ramas totales}}$$

El algoritmo crea una matriz de distancias, que sirve para visualizar la variabilidad entre los grupos a través del análisis de coordenadas principales (PCoA) en Emperor<sup>77</sup>. Para confirmar si la diversidad  $\beta$  era similar intra grupos se evaluó la variación de las distancias ponderadas UniFrac usando la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Para evaluar la diferencia en la diversidad  $\beta$  entre grupos se comparó la distancia filogenética de las muestras de cada diagnóstico histopatológico VPH positivo (sin lesión en cérvix VPH positivo, LEI y CaCU) con respecto al grupo de referencia (grupo de mujeres sin lesión en cérvix, VPH negativo) mediante la prueba estadística U de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa STATA versión 12 (StataCorp, Collage Station, TX, USA) para Windows.

## **Metodología para objetivo 2**

Para cumplir con el segundo objetivo específico: Evaluar el nivel de expresión de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  a nivel del cérvix de cada estadio de la historia natural del CaCU.

### **Curvas de rangos dinámicos**

Para estandarizar la reacción de PCR en tiempo real, se realizaron curvas de rangos dinámicos con el ADNc de linfocitos de sangre periférica (LSP) recién obtenida de donantes voluntarias. Los LSP fueron estimulados con fitohemaglutinina (PHA), se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, por sus sigls en inglés) y fueron cultivadas junto a su respectivo control (LSP sin estimular) a las 24, 48 y 72h. Se agregó Trizol y fueron guardados a -20°C para la extracción posterior de ARNm de acuerdo a las especificaciones del fabricante para extracción de ácidos nucleicos por trizol. Se cuantificó la concentración de ARNm con el espectrofotómetro (260/280) NanoDrop™ 1000 de Thermo Scientific y la integridad del ARN fue determinada mediante la amplificación por PCR del gen constitutivo (GAPDH). A continuación se realizó la síntesis de ADNc que se utilizó como templado.

Teniendo en cuenta, que los niveles de expresión de las citocinas varían en periodos de tiempo corto a nivel fisiológico (24, 48 y 72h)<sup>78</sup>, se evaluó a partir de que ADNc (24, 48 o 72h) se realizaría el estándar para la elaboración de las curvas de rangos dinámicos, basado en el tiempo en el cual se obtuvo mayor expresión al hacer la qPCR de cada citocina por duplicado, normalizado con el gen GAPDH.

Se hicieron diluciones seriadas 1:5000 para realizar los rangos dinámicos, amplificando por triplicado en el equipo StepOne™ de Applied Biosystems. Con los datos obtenidos se generaron las curvas estándar para determinar el nivel relativo de expresión de cada citocina normalizada por el endógeno GAPDH (Anexo 3).

### **qRT-PCR**

Se evaluó el nivel de expresión del ARNm de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , obtenido de las muestras de exudado de cérvix para el caso de mujeres sin lesión en cérvix y de muestras de biopsias de cérvix de mujeres con lesión premaligna en cérvix y CaCU, por qRT-PCR. Para éste proceso, se utilizaron sondas TaqMan comerciales (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para IL-4 (ID-Hs00174122m1), IL-6 (ID-Hs00174131m1), IL-10 (ID-Hs00961622m1), TGF- $\beta$ 1 (ID-Hs00961622m1), TNF- $\alpha$  (ID-(Hs00174128\_m1) y para IFN- $\gamma$  (ID-Hs00174143m1), y se normalizó el análisis de expresión génica de cada citocina con el gen endógeno GAPDH. Las mediciones se realizaron por duplicado en el equipo StepOne™ de Applied Biosystems.

El nivel de expresión de ARNm para los genes estudiados, se calculó mediante la cuantificación relativa de cada gen respecto al gen endógeno (GAPDH) con el método Ct comparativo ( $2^{-\Delta Ct}$ )<sup>79</sup>. Los niveles de expresión obtenidos para cada citocina, se representaron en gráficas de caja bigote, comparando frente al grupo de referencia (sin lesión independientemente del estatus de infección por VPH), los grupos con diagnóstico histopatológico de LEI y CaCU.

Para evaluar si existía diferencia entre la expresión de las citocinas en el grupo control y el de casos (LEI o CaCU) se realizó la prueba estadística de U de Man Withney. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa STATA versión 12 (StataCorp, Collage Station, TX, USA) para Windows.

### **Metodología para objetivo 3**

Para cumplir el tercer objetivo específico: Determinar la asociación entre la diversidad (índice de entropía de Shannon) y/o composición (índice PD whole tree) de la microbiota del cérvix, con infección por VPH, lesión premaligna en cérvix y cáncer cervicouterino.

Se realizaron las curvas de rarefacción del índice de Shannon y PD whole tree. Después de comprobar si las variables tenían una distribución normal con la prueba de Shapiro Wilk, se realizaron análisis de diferencias de medias con pruebas t, para determinar si las diferencias encontradas para estos dos índices entre los grupos por diagnóstico histopatológico, eran estadísticamente significativas. Así mismo, se evaluó la asociación de la diferencia estimada de medias de cada índice de diversidad alfa por diagnóstico histopatológico (LEI y CACU versus sin lesión en cérvix independientemente del estatus de VPH), mediante análisis de regresión lineal ajustando por edad, método anticonceptivo y genotipo de VPH. De igual forma, se evaluó la asociación entre el diagnóstico histopatológico (LEI y CACU versus sin lesión en cérvix independientemente del estatus de VPH), y los índices de Shannon y PD whole tree, mediante regresión logística, ajustando por edad, método anticonceptivo y genotipo de VPH. Se estimó el OR (odds ratio) con su respectivo intervalo de confianza al 95%. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa STATA versión 12 (StataCorp, Collage Station, TX, USA) para Windows.

#### **Metodología para objetivo 4**

Para cumplir el cuarto objetivo específico: Evaluar la diferencia de los niveles de expresión de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  a nivel del cérvix, por cada tipo de comunidad bacteriana identificada.

Se realizó el análisis por la prueba estadística de Kruskal Wallis. Se representaron los resultados en gráficas de caja bigote, comparando frente al grupo de referencia (CSTI) cada CST. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa STATA versión 12 (StataCorp, Collage Station, TX, USA) para Windows.

## **Metodología para objetivo 5**

Para alcanzar el objetivo 5: Investigar si existe correlación entre los índices de diversidad de la microbiota con el nivel de expresión de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  a nivel de cérvix y el diagnóstico histopatológico.

Se realizó un análisis de correlación por ORs tanto del índice de Shannon e índice PD Whole tree con los niveles de expresión de cada citocina en cérvix normalizado por el gen endógeno GAPDH, teniendo en cuenta que la distribución de la variable nivel de expresión de citocinas no se distribuyó normalmente.

## **Resultados**

### ***Análisis descriptivo de la población estudiada***

Las características sociodemográficas y antecedentes gineco-obstétricos de la población de estudio se presentan en el cuadro 7. La población de estudio (n=29) estuvo conformada por 17 mujeres que formaron el grupo control (siete sin lesión en cérvix, VPH negativas y 10 sin lesión en cérvix, VPH positivas), cuatro mujeres con diagnóstico histopatológico de LEI y ocho con diagnóstico histopatológico de CaCU.

Hubo diferencias significativas entre los grupos para las variables método anticonceptivo ( $p=0.021$ ) y genotipo de VPH ( $p=0.003$ ). Los casos de CaCU reportaron en su mayoría el no uso de métodos anticonceptivos, los casos de LEI el uso de métodos de barrera no hormonales y los casos sin lesión en cérvix el uso de métodos hormonales. La prevalencia global de VPH en la población estudiada fue de 58.8%. El genotipo de VPH más prevalente en los casos con LEI fue el genotipo oncogénico no VPH-16 o 18 (75%) y en los casos de CaCU el genotipo de VPH-16 (75%).

**Cuadro 5. Características generales de la población de estudio por diagnóstico histopatológico**

Características	Diagnóstico Histopatológico	
	SL/LEI/CaCU n=17/4/8	Valor P&
<b>Demográficas</b>		
Edad (años) *		
Media (DS)	34(8)/40(14)/43(11)	0.13
Edad menarca (y)*		
Media(DS)	13(1)/14(3)/13(3)	0.77
<b>Comportamiento</b>		
Edad inicio de actividad sexual(y)*		
Media (DS)	17(1)/19(3)/17(4)	0.23
Número de embarazos+		
≤3	88.2/75/62.5	0.28
>3	11.8/25/37.5	
Número de parejas sexuales+		
≤3	82.3/75/75	0.89
>3	17.6/25/25	
Método anticonceptivo+		
Ninguno	6/0/50	<b>0.013</b>
No hormonal	47/100/37.5	
Hormonal de 6 meses -5 años	47/0/12.5	
Antecedentes familiares de cáncer+		
No	11.8/0/75	0.46
Si	88.2/100/25	
Antecedentes consumo de tabaco+		
No	82.4/50/62.5	0.32
Si	17.6/50/37.5	
<b>Biológicas/Clínicas</b>		
Antecedentes de ITS +		
Ninguna	58.8/50/100	0.11
Vaginositis	11.76/25/0	
Candidiasis	23.53/0/0	
Molusco contagioso	5.88/0/0	
VPH	0/25/0	
Test positivo para VPH+		
Negativo	41.18/0/0	<b>0.003</b>
No VPH 16 and VPH 18	17.65/75/0	
VPH 18	0/0/25	
VPH 16	41.18/25/75	
Seroprevalencia VHS-2		
Positivo	5.88/0/37.5	0.07
Negativo	94.12/100/62.5	

SL: Sin lesión en cérvix; LEI: Lesión Escamosa Intraepitelial; CaCU: cáncer cervicouterino

VHS-2: Virus Herpes Simplex -2. ITS: Infecciones de transmisión sexual

Para variables continuas, los resultados están expresados como medias con su respectiva desviación estándar (DE)

Las variables categóricas son expresadas en porcentajes

& valor p. Para las variables categóricas\* se usó el estadístico de prueba  $\chi^2$  y para las variables continuas

Kruskall Wallis+

Texto en negritas denota valores significativos de p ( $p < 0.05$ ).

### Análisis de la secuenciación

Las secuencias obtenidas tras la secuenciación, que no cumplieron con el control de calidad fueron descartadas para los análisis posteriores. Se realizó la asignación de secuencias por muestra, en este paso se eliminaron del estudio las muestras que no presentaron MID o identificador. La dispersión de las lecturas por muestra se resume en el cuadro 8. Sorprendentemente, no se encontraron secuencias con el MID1 en ninguna de las ocho regiones, por lo que se envió a secuenciar por el método de Sanger, los amplicones supuestamente amplificados con el cebador que contenía el MID1. Los resultados revelaron que estos amplicones tenían la secuencia del MID2, lo que quiere decir que en cada región hubo dos muestras con el mismo identificador; por lo que las muestras con MID2 fueron excluidas del análisis, por la imposibilidad de discriminar entre las secuencias que provenían de cada muestra.

**Cuadro 6. Dispersión de las lecturas por muestras**, las secuencias de las muestras marcadas en amarillo fueron descartadas del estudio por falta de secuencias o por tener menos de 1000 lecturas, parámetro recomendado<sup>61</sup> para tener una profundidad de secuenciación adecuada para el análisis.

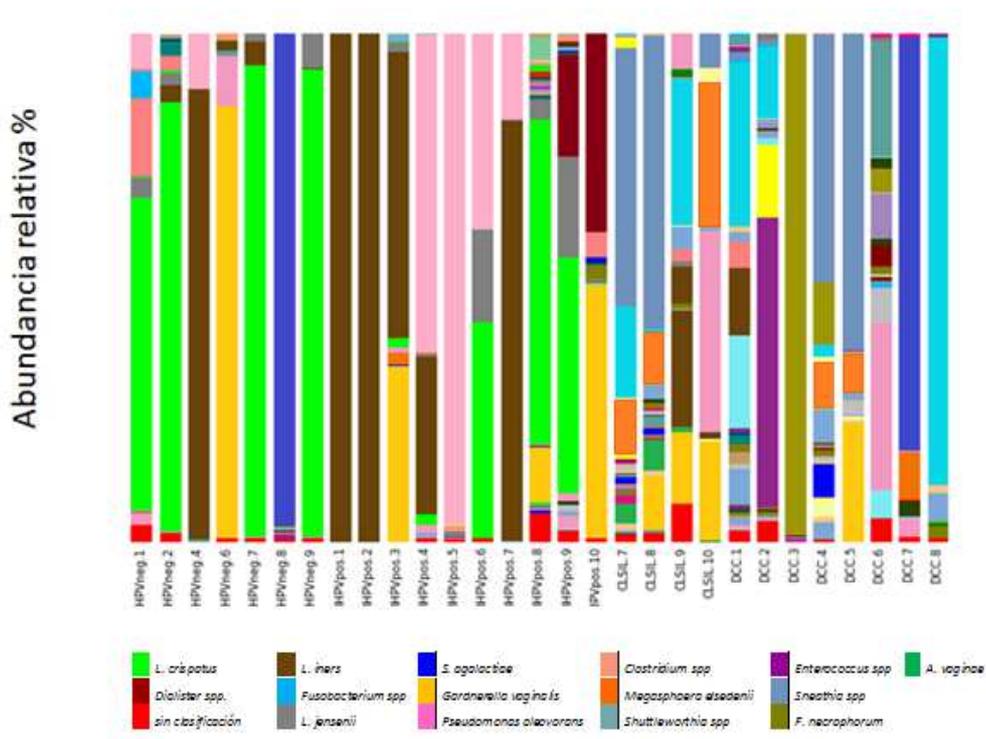
	Región 1		Región 2		Región 3		Región 4		Región 5		Región 6		Región 7		Región 8	
MID	Muestra	Lecturas														
1	26C	0	163C	0	195C	0	214C	0	259C	0	334G	0	4C	0	128C	0
2	251C	2572	137C	16551	219C	6850	220C	2947	237C	8003	240C	1665	255C	20970	256C	5576
3	257C	32758	260C	6850	1C	10195	230C	7361	91C	23426	238G	5114	247G	114	349G	4115
4	363G	810	322G	3909	361G	19576	359G	3437	263G	2579	241G	385	258G	24456	337G	3769
5	342G	9072	351G	9647	352G	2656	354G	8653	356G	14981	338G	12219	374G	5789	257G	1341
6	90	1041	92	1729	32	2240	93	7227	100	1350	56	1241	85	20322	152	22553

Después del filtrado de lecturas por control de calidad, quedaron 311,813 secuencias de alta calidad dispersas de manera desigual entre las muestras (cuadro 8). Para evitar posibles sesgos en los análisis subsiguientes debido a la diferencia en la profundidad de secuenciación de las muestras, se tomaron submuestras aleatorias de mil secuencias a partir de los datos brutos de cada muestra para el resto de los análisis. Se estima que 1000 secuencias proveen un buen balance de información entre número de muestras y profundidad de secuenciación de acuerdo a Mica Hamady y Rob

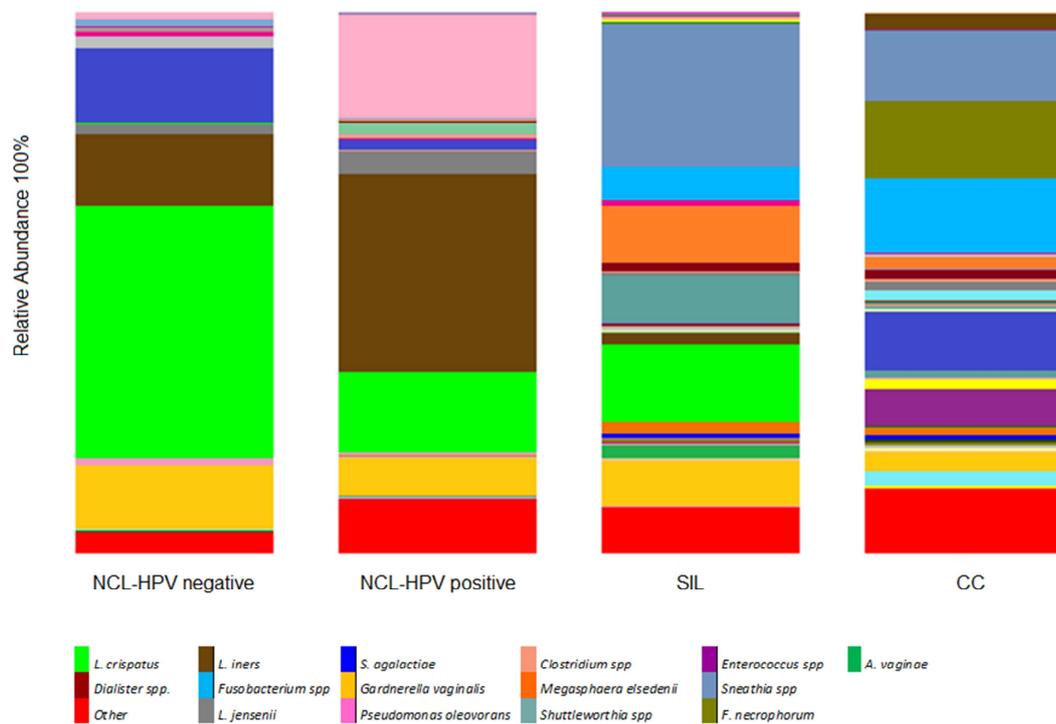
Knight<sup>61</sup>. Las muestras que no tenían al menos 1000 lecturas fueron descartadas. Las curvas de rarefacción (Figura 11) de la diversidad alfa basadas en el índice de Shannon, muestran que después del cálculo para 400 lecturas, la diversidad no incrementó más; de manera que 1000 secuencias fue un corte de profundidad suficiente en la secuenciación para este estudio.

La composición de la microbiota del cérvix se representa de acuerdo a la abundancia relativa de especies por cada muestra en la figura 7, y ordenadas por estadio (sin LEI VPH negativas, sin LEI VPH positivas, LEI y CaCU) en la gráfica subsiguiente (Figura 8). Al evaluar la distribución de los géneros y especies bacterianas por muestra, se observó que en las muestras de casos sin lesión en cérvix predominaron las especies de *Lactobacillus*, en las mujeres VPH negativas predominó la especie de *L. crispatus* (46.45%), con una disminución en mujeres VPH positivas (14.95%), siendo más evidente esta disminución a medida que progresa la malignidad en el cérvix (14.36%) en mujeres con LEI y (1.3%) en los casos de CaCU. Otra especie de *Lactobacillus* representada en menor proporción que *L. crispatus* en los casos sin lesión en cérvix fue *L. iners*, especie que estuvo mayormente representada en los casos VPH positivos al compararlos con los VPH negativos (36.53% vs. 13.25% respectivamente), con una disminución marcada en los casos de LEI (2.1%) e indetectable en los casos de CaCU. Interesantemente se observó que la proporción de *L. crispatus* vs *L. iners* se invierte en presencia del VPH y a medida que progresa la malignidad en el cérvix hay una disminución de las especies de *Lactobacillus*. Otras especies de *Lactobacillus* como *L. jensenii* y *L. vaginalis* solo se encontraron en mujeres sin LEI. *Gardnerella vaginalis* fue encontrada principalmente en mujeres sin LEI (11.5%) y disminuyó a 6.8% en mujeres sin LEI VPH positivas, 8.1% en LEI y 3.3% en CaCU. Hubo dos muestras (una sin LEI VPH negativa y otra con CaCU) donde *S. agalactiae* representó más del 80% de la composición de su microbiota. Por otra parte, se observó que hubo muestras sin LEI VPH positivas donde predominó la especie de *Pseudomonas oleovorans* representando el 19% de éste grupo; en el grupo de casos sin LEI VPH negativos estuvo presente en 1.3% y en los casos con LEI y CaCU no fue detectada.

En contraste, bacterias del orden Fusobacteriales y Clostridiales solo se encontraron en muestras de casos con LEI y CaCU. En específico, *Sneathia spp*, *Fusobacterium spp*, *Shuttleworthia satelles*, *Megasphaera elsdenii* se encontraron en los grupos de LEI y CaCU. En el grupo de mujeres con LEI se observó la presencia de *Fusobacterium spp*. en 6.3%, *Sneathia spp*. 26.6%, *Shuttleworthia satelles* en 8.7% y *Megasphaera elsdenii* en 10.4%. La abundancia relativa de estos géneros y especies bacterianas fue distinta en los casos de CaCU (14%, 12.9%, 0% y 2.2%, respectivamente). La bacteria *Fusobacterium necrophorum* solo se encontró en el grupo de CaCU, en una abundancia relativa de 14.19%. Esto sugiere que la diversidad de la microbiota del cérvix aumenta conforme incrementa la malignidad de las lesiones en cérvix y que su composición es distinta entre los grupos analizados.



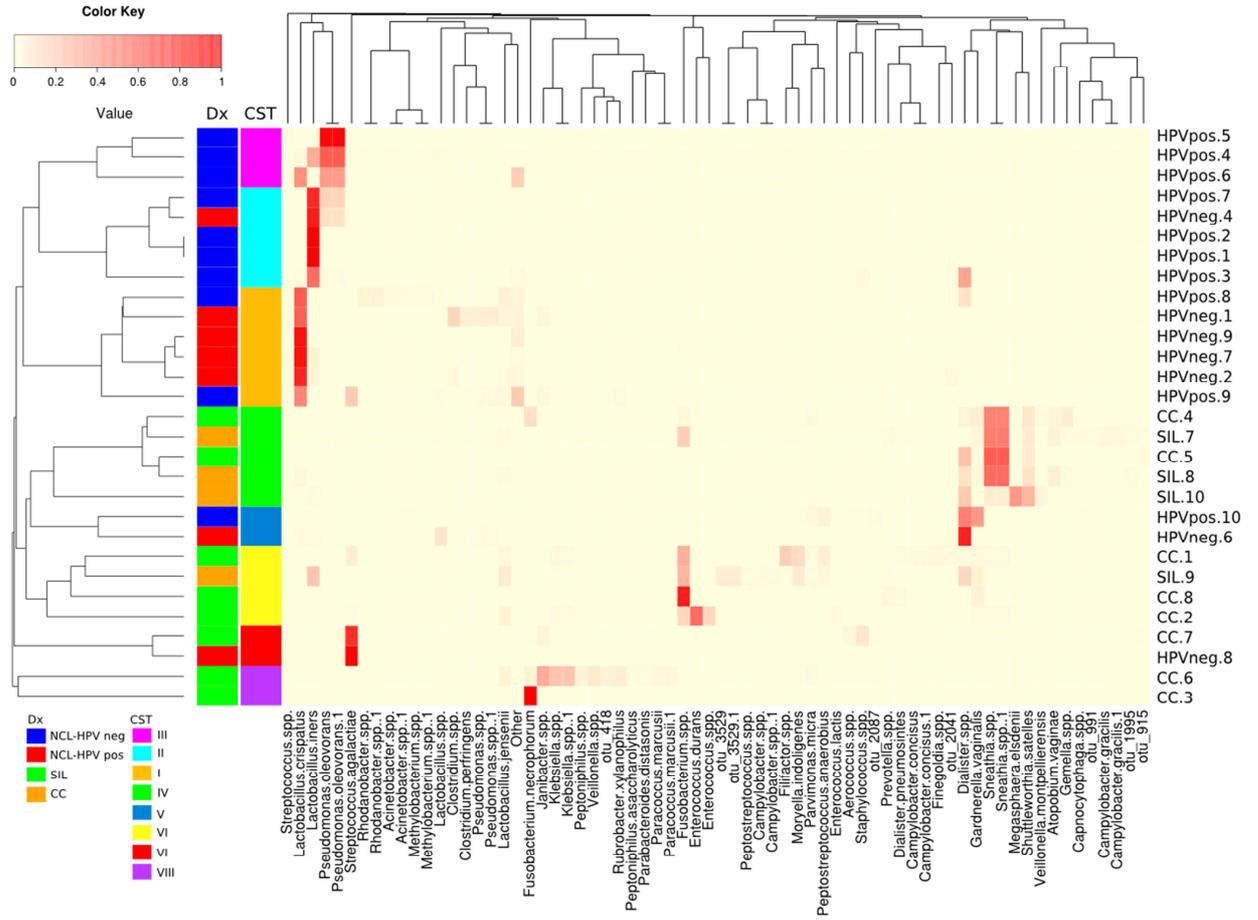
**Figura 7. Composición de la microbiota en cérvix por muestra.** Gráfico de barras que muestra la abundancia relativa por caso evaluado. La barra completa representa el 100% de las secuencias de cada caso.



**Figura 8. Composición de la microbiota de cérvix por diagnóstico histopatológico.** Gráfico de barras que muestra la abundancia relativa de grupos y especies bacterianas por diagnóstico histopatológico. La barra completa representa el 100% de las secuencias de cada diagnóstico histopatológico.

Al evaluar si la composición de la microbiota de cérvix se representaba de manera característica por diagnóstico histopatológico, se elaboró un mapa de calor no supervisado basado en la disimilitud de Bray Curtis (Figura 9). Las distancias filogenéticas fueron analizadas por agrupamiento jerárquico promedio. Al analizar el mapa de calor, se observó un agrupamiento homogéneo por diagnóstico histopatológico, así la composición de la microbiota en cérvix fue similar a nivel intragrupal y distinta entre grupos. Se identificaron ocho grupos de comunidades bacterianas, que se denominaron tipo de comunidad (community state type-CST, por sus siglas en inglés), de acuerdo a la bacteria más abundante en cada muestra. El CST I estuvo representado mayormente por *L. crispatus*, en 21% de las muestras, el CST II

representado por *L. iners* (17%), el CST III por *Pseudomonas oleovorans*, en 10% de las muestras, el CST IV representado por *Sneathia spp.*, en 17% de las muestras, el CST V representado por *Gardnerella vaginalis*, en 7% de las muestras, el CST VI representado por *Streptococcus agalactiae*, en 7% de las muestras, el CST VII representado por *Fusobacterium necrophorum*, en 7% de las muestras y el CST VIII representado por *Fusobacterium spp.*, en 14% de las muestras. El cuadro 9 muestra la distribución de los casos por CST. A excepción del CST VI, todos los demás CST se representaron por un diagnóstico histopatológico particular, el CST I estuvo primordialmente por casos sin LEI-VPH negativas, el CST II y III estuvo representado principalmente por casos sin LEI-VPH positivas, el CST IV se presentó en mayor proporción en los casos de LEI, el CST V estuvo representado en su mayoría por casos sin LEI independientemente del status de VPH, el CST VIII que estuvo compuesto principalmente por casos de CaCU y el CST VII representado solo por casos de CaCU.



**Figura 9. Composición de las comunidades bacterianas a nivel de especie por caso evaluado.** Mapa de calor no supervisado de las proporciones de taxas que representan la composición de la microbiota de cérvix por caso evaluado; generado a partir de la disimilitud de Bray Curtis entre los casos. En el eje X están los nombres de los taxas que tuvieron al menos 1% de abundancia relativa. En el eje Y del lado izquierdo se representó el diagnóstico histopatológico de cada caso en rojo: SLEI-VPH negativo; en azul: SLEI-VPH positivo; en naranja: LEI y en verde: CaCU. El tipo de comunidad (CST) está representado por colores. Del lado derecho están los nombres de los casos analizados. El cladograma superior indica la proximidad evolutiva entre las especies representadas. El cladograma izquierdo representa la similitud entre la composición de la microbiota de cérvix.

**Cuadro 9. Distribución de los diagnósticos histopatológicos por tipo de comunidad bacteriana (CST)**

Diagnóstico histopatológico	CST								Total
	I (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	V (%)	VI (%)	VII (%)	VIII (%)	
SL-VPH negativo	4(57)	1(14)	0	0	1(14)	1(14)	0	0	7
SL-VPH positivo	2(20)	4(40)	3(30)	0	1(10)	0	0	0	10
LEI	0	0	0	3(75)	0	0	0	1(25)	4
CaCU	0	0	0	2(25)	0	1(12)	2(25)	3(37)	8
Total	6 (21)	5 (17)	3 (10)	5 (17)	2 (7)	2 (7)	2 (7)	4 (14)	29

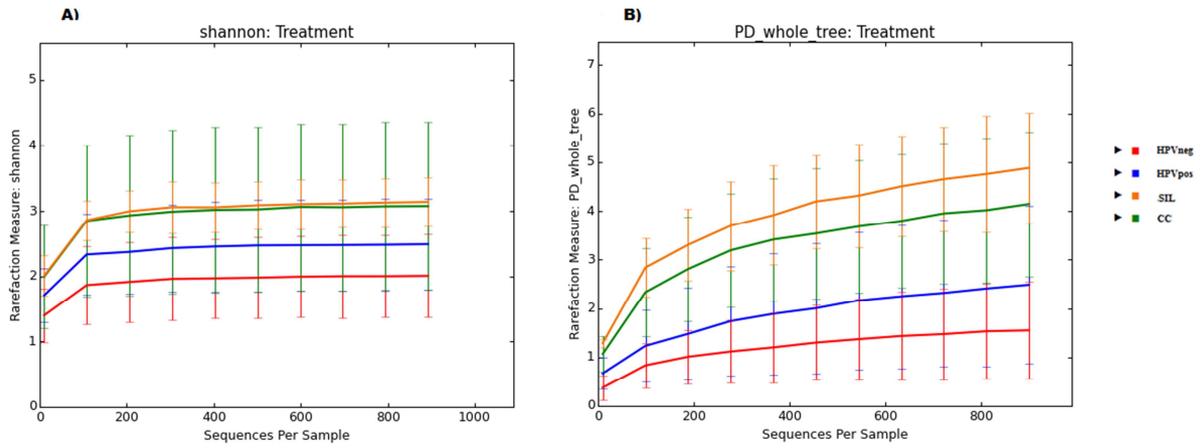
CST I (dominado por *Lactobacillus crispatus*), CST II (dominado por *Lactobacillus iners*), CST III (dominado por *Pseudomonas oleovorans*), CST IV (dominado por *Sneathia spp.*), CST V (dominado por *Gardnerella vaginalis*), CST VI (dominado por *Streptococcus agalactiae*), CST VII (dominado por *Fusobacterium necrophorum*), CST VIII (dominado por *Fusobacterium spp.*),

SL: Sin Lesión; LEI: Lesión Escamosa Intraepitelial; CaCU: Cáncer Cervicouterino

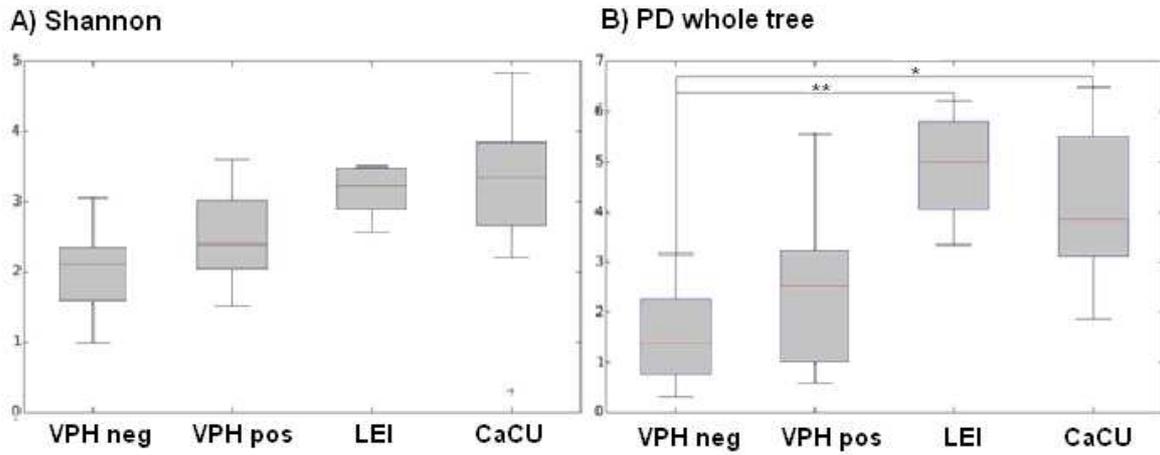
## **Comparación de la diversidad de la microbiota de cérvix en cada etapa de la historia natural del CaCU**

### ***Diversidad Alfa***

La diversidad alfa fue calculada con los índices de entropía Shannon y el de diversidad filogenética PD whole tree. Las curvas de rarefacción (Figura 10), representan los valores que adquiere cada índice al tomar muestras aleatorias cada vez mayores. Al evaluar las curvas de rarefacción, se observó una diversidad mayor en los casos de LEI y CaCU al compararlos con los casos SLEI VPH negativos. Aunque las curvas de rarefacción, para el índice de Shannon, mostraron una tendencia en la diversidad a incrementar conforme incrementa el grado de malignidad en cérvix, la diversidad *per se*, (sólo tomando en cuenta riqueza y abundancia relativa) no es suficiente para determinar el estadio de la historia natural del CaCU en la que se encuentra. No obstante, cuando se utilizan índices que toman en cuenta la composición filogenética como el PD whole tree, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las medias del PD whole tree de los grupos SLEI-VPH negativas vs. LEI y SLEI-VPH negativas vs. CaCU, ( $p=0.006$  y  $p=0.036$ , respectivamente) (Cuadro 10). La figura 11 muestra la distribución de los índices de diversidad entre los grupos de diagnóstico histopatológico.



**Figura 10. Curvas de rarefacción de la diversidad alfa.** A) Curvas de rarefacción del índice de Shannon. B) Curvas de rarefacción del índice de diversidad filogenética PD whole tree.



**Figura 11 Distribución de los índices de diversidad Shannon y PD whole tree por diagnóstico histopatológico.** \*\* valor  $p < 0.01$ , \* valor  $p > 0.05$ .

**Cuadro 10. Análisis de la diferencia de medias del índice de Shannon o el índice de diversidad filogenética PD whole tree entre grupos con distintos diagnósticos histopatológicos de la historia natural del CaCU.**

Diagnóstico Histopatológico		Índice de Shannon			PD Whole Tree		
Grupo 1	Grupo 2	Media (DE)1	Media (DE)2	Valor p &	Media (DE)1	Media (DE)2	Valor p &
SL-VPHneg	SL-VPHpos	2.00 (0.63)	2.49 (0.70)	1	1.55 (0.99)	2.49 (1.61)	1
SL-VPHneg	LEI	2.00 (0.63)	3.14 (0.38)	0.18	1.55 (0.99)	4.88 (1.13)	<b>0.006</b>
SL-VPHneg	CaCU	2.00 (0.63)	3.08 (1.28)	0.498	1.55 (0.99)	4.14 (1.49)	<b>0.036</b>
SL-VPHpos	LEI	2.49 (0.70)	3.14 (0.38)	0.792	2.49 (1.61)	4.88 (1.13)	0.174
SL-VPHpos	CaCU	2.49 (0.70)	3.08 (1.28)	1	2.49 (1.61)	4.14 (1.49)	0.318
LEI	CaCU	3.14 (0.38)	3.08 (1.28)	1	4.88 (1.13)	4.14 (1.49)	1

SL: Sin Lesión; LEI: Lesión Escamosa Intraepitelial; CaCU:cáncer cervicouterino

PD: Diversidad filogenética

& valor de P, prueba estadística t-student

El texto en negritas denota un valor p significativo (p<0.05).

Al evaluar la asociación entre el diagnóstico histopatológico (sin LEI independiente de su estatus de VPH, LEI y CaCU) y los índices de Shannon y PD whole tree por regresión logística, no se encontró asociación significativa (Cuadro 11).

**Cuadro 11. Análisis de asociación entre el diagnóstico histopatológico y los índices de Shannon y PD whole tree**

Diagnóstico Histopatológico	n	Índice de Shannon		PD Whole Tree	
		RMa (95% IC)	Valor p*	RMa (95% IC)	Valor p*
SL independiente del estado de VPH	17	1		1	
LEI/CaCU	12(4/8)	3.35(0.636-17.654)	0.15	3.30(0.756-14.485)	0.11

SL: sin lesión; LEI: lesión escamosa intraepitelial; CaCU: cáncer cervicouterino

a. Razón de momios ajustada por edad, método anticonceptivo y genotipo de VPH

Por otro lado, cuando se evaluó la asociación del índice de Shannon con el diagnóstico histopatológico por regresión lineal ajustando por edad, genotipo de VPH y método anticonceptivo, se encontró una diferencia estimada de medias del índice de Shannon

de 1.11 unidades bits más en los casos de CaCU con respecto al grupo de referencia, casos sin LEI VPH negativo ( $p= 0.04$ ) (Cuadro 12).

**Cuadro 12. Diferencia estimada de medias de unidades bits (índice de Shannon) de la diversidad bacteriana en cérvix entre el grupo SLEI (independientemente del estado de VPH) y LEI o CaCU**

Diagnóstico histopatológico	n	Índice de Shannon	
		$\beta_a$ (CI95%)	Valor p*
LEI	17	0.60(-0.579-1.794)	0.30
CaCU	12(4/8)	1.11 (0.057-2.165)	<b>0.04</b>

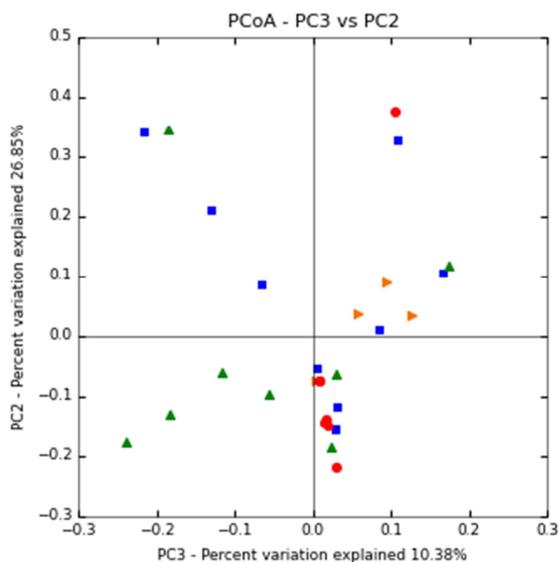
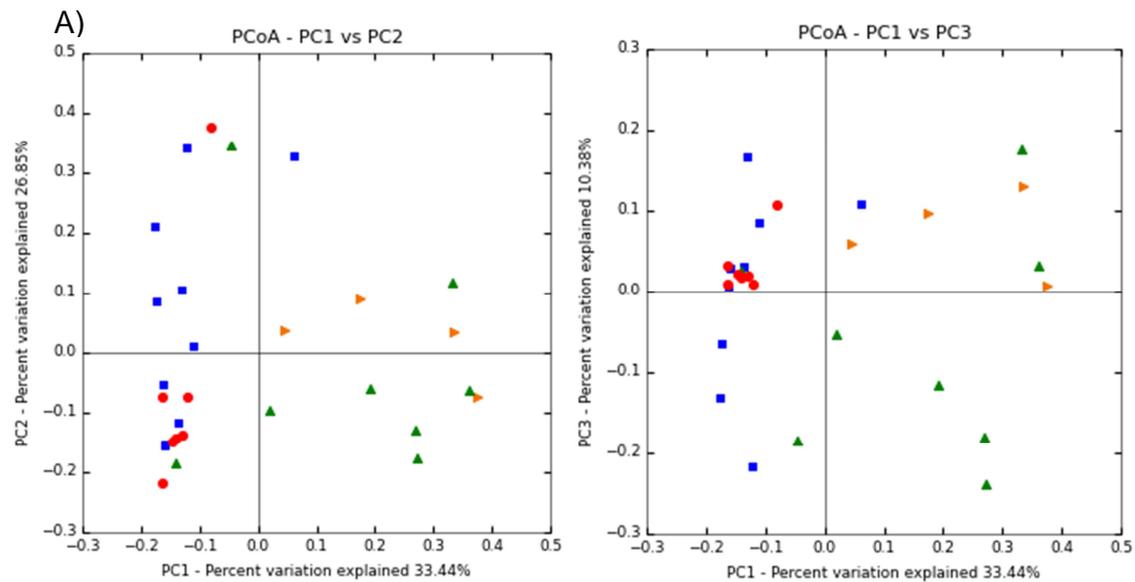
Texto en negritas denota un valor p significativo ( $p<0.05$ ).

<sup>a</sup> Coeficiente  $\beta$  ajustado por edad, método anticonceptivo y genotipo-VPH

El índice de Shannon esta expresado en unidades bits

### **Diversidad- $\beta$**

Se evaluó la diversidad- $\beta$  (entre grupos) usando la matriz de distancias creada con el algoritmo weighted UniFrac dentro de QIIME, misma que se utilizó para hacer el análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura 12A). Los resultados del PCoA mostraron consistentemente que la microbiota de cérvix fue notablemente distinta al comparar las distintas etapas del CaCU. Los tres componentes principales (PC) que explicaron la mayor proporción de la variación entre la composición de la microbiota del cérvix de las muestras fueron gráficos en dos dimensiones. El PC1 explicó el 33.34% de la variación entre muestras, el PC2 el 26.85% y el PC3 10.38%. La presencia de *Fusobacterium spp.*, *Sneathia spp.* y *Megasphaera spp.*, fue relacionada al PC1. La presencia de *Bifidobacteria spp.* y *Pseudomonas spp.*, fue relacionada al PC2. La ausencia de *Fusobacterium spp.* y la presencia de géneros de *Bifidobacteriaceae* fueron relacionados al PC3 de acuerdo a la matriz de carga calculada para este análisis (Figura 12B).



B)

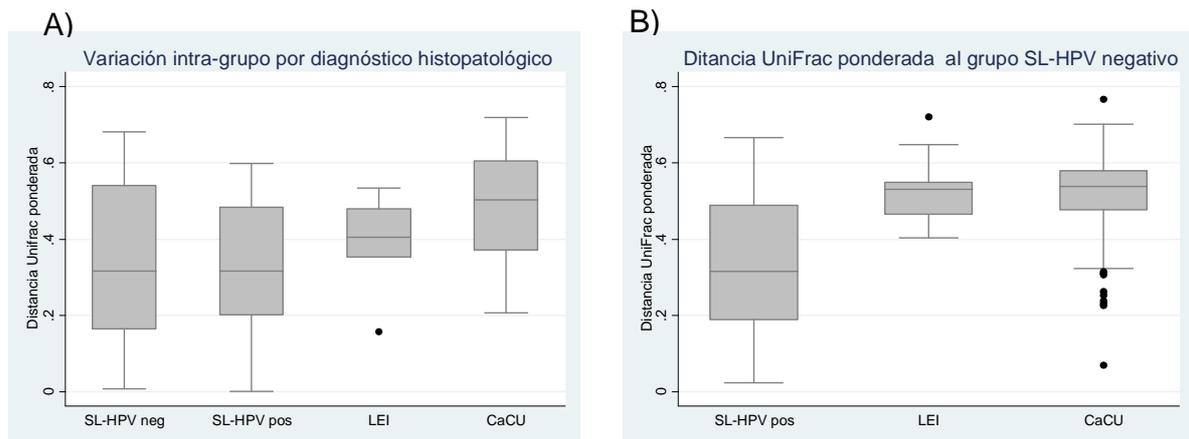
Matriz de Carga para la Composición de la Microbiota de Cérvix			
Taxas	PC1	PC2	PC3
<i>Lactobacillus spp.</i>	-0.14	-0.07	0.02
<i>Bifidobacteriaceae spp.</i>	0.03	<b>0.23</b>	<b>0.11</b>
<i>Fusobacterium spp.</i>	<b>0.25</b>	-0.12	-0.16
<i>Pseudomonas spp.</i>	-0.15	<b>0.19</b>	-0.12
<i>Sneathia spp.</i>	<b>0.34</b>	0.01	0.09
<i>Streptococcus spp.</i>	-0.14	-0.18	0.02
<i>Mycoplasma spp.</i>	0.09	0.00	0.02
<i>Enterococcus spp.</i>	0.02	-0.10	-0.05
<i>Megasphaera spp.</i>	<b>0.28</b>	0.04	0.09
<i>Dialister spp.</i>	<b>0.16</b>	<b>0.12</b>	0.03

Figura 12. A) Diversidad  $\beta$  de la composición de la microbiota en cérvix por diagnóstico histopatológico visualizada por PCoA. El PC1 explicó el 33.44% de la variación de la composición de la microbiota de cérvix por la presencia de especies de *Fusobacterias* y *Sneathia*. El PC2 explicó el 26.85% de la variación de la composición de la microbiota de cérvix por la presencia de *Bifidobacterias* y *Pseudomonas*. El PC3 explicó el 10.38% de la variación de la composición de la microbiota de cérvix por la presencia de *Lactobacillus* y *Streptococcus*. B) Matriz de carga atribuible a cada bacteria dentro de los componentes principales.

Al graficar los PC1 vs PC2, se observó como la mayoría de las muestras SLEI VPH negativas, se agruparon juntas en el tercer cuadrante y ninguna fue observada en el cuadrante IV, lo que quiere decir que carecen de *Sneathia spp.*, *Fusobacterium spp.* y *Pseudomonas spp.*, al contrario de los casos con LEI y CaCU que se encontraron en el primer y cuarto cuadrantes y por lo tanto cuentan con la presencia de las especies bacteriana antes mencionadas. En la gráfica del PC1 vs PC3, se agruparon en el segundo cuadrante todas las muestras SLEI-VPH negativas, mientras el 50% de los casos de CaCU se agruparon en el cuarto cuadrante, lo que significa que contienen *Sneathia spp.* y *Fusobacterium spp.*, pero carecen de los géneros *Bifidobacteriaceae*. Todos los casos de LEI se agruparon en el primer cuadrante indicando que contienen *Sneathia spp.*, *Fusobacterium spp.* y cierta proporción de *Bifidobacteriaceae*.

La gráfica del PC2 vs el PC3, agrupó al 50% de los casos de CaCU en el tercer cuadrante, al 75% de los casos de LEI en el primer cuadrante y en el cuarto cuadrante se agruparon todos los casos sin LEI-VPH negativo, mientras los casos sin LEI-VPH positivos se encontraron dispersos entre los cuadrantes I, II y IV.

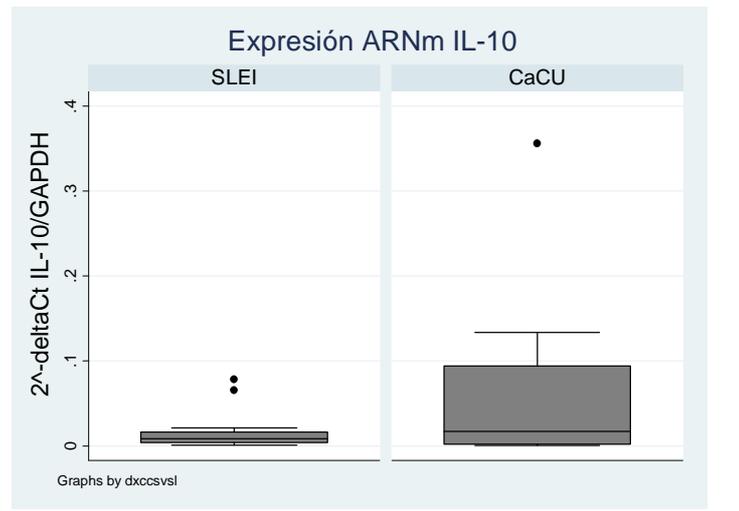
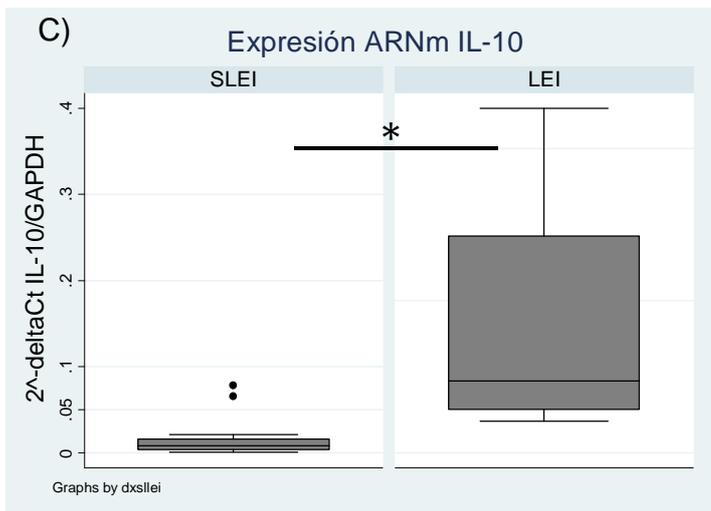
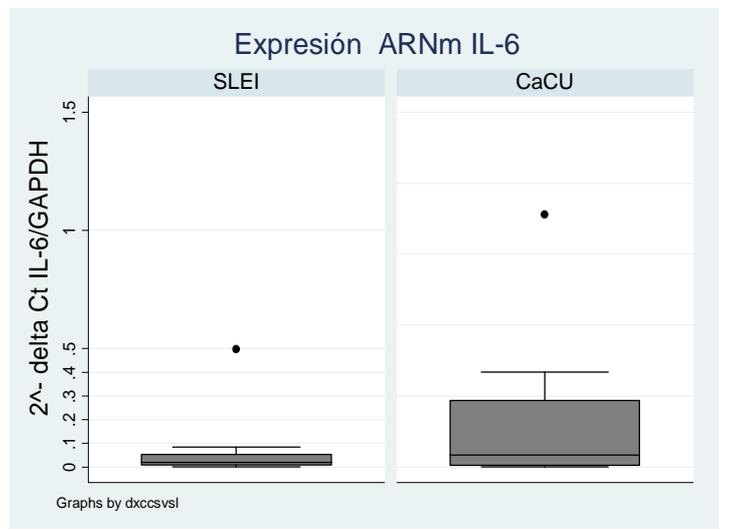
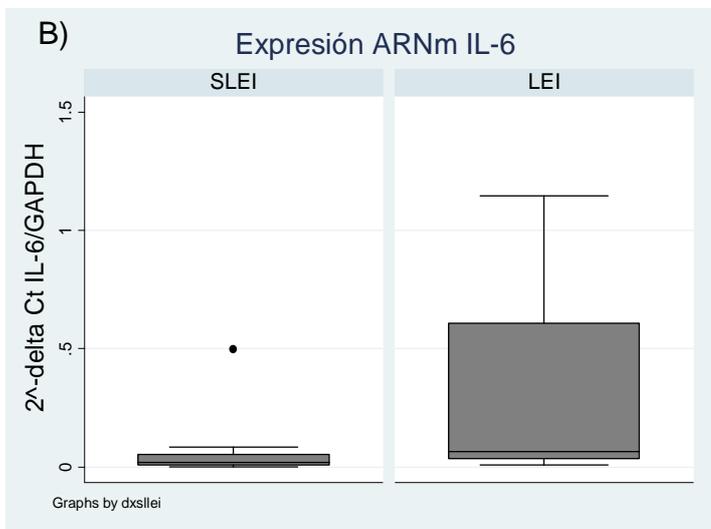
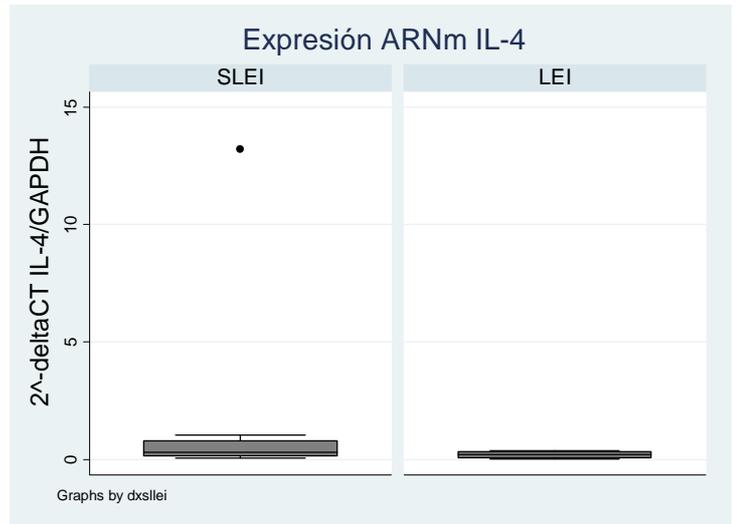
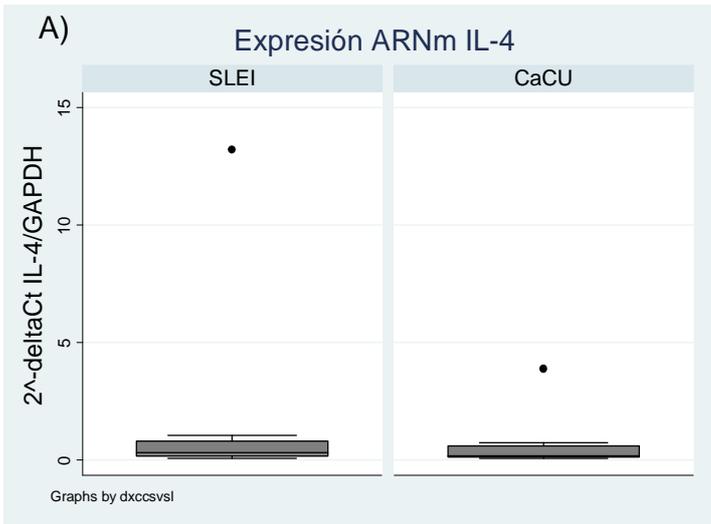
Al evaluar la significancia de la diversidad  $\beta$ , se encontró que la distribución de las distancias ponderadas UniFrac tuvieron la mayor variación dentro del grupo de casos de CaCU (Figura 13A, Kruskal–Wallis,  $p < 0.0006$ ), así como la mayor distancia UniFrac hacia el grupo de referencia SLEI-VPH negativo (Figura 13B, Kruskal Wallis,  $p < 0.00001$ ).



**Figura13. Diversidad  $\beta$ . (A). Variación intragrupo por diagnóstico histopatológico (Weighted UniFrac). (B). Distancia UniFrac de los casos sin LEI-VPH positivo, LEI y CaCU hacia el grupo de referencia (sin LEI-VPH negativo).**

**Niveles de Expresión de citocinas IL-10, IL-6, IL-4, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ 1a nivel del cérvix**

Por estadio: Al comparar los resultados de los niveles de expresión del ARNm de IL-10, IL-6, IL-4, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ 1 normalizados por el gen endógeno GAPDH, por duplicado, entre los controles SLEI (independientemente del estado de VPH) vs. los casos de LEI o CaCU, se encontró sólo diferencia significativa entre las medianas de expresión del ARNm de IL-10 a nivel de cérvix en los casos de LEI y el grupo control, con el estadístico de prueba U de Mann-Whitney ( $p=0.04$ ), (figura 14). Se encontró un cambio leve del patrón de expresión de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 en los casos con LEI y CaCU vs SLEI; sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. En los casos de CaCU, sólo fue detectable la expresión de IL-4 y TGF- $\beta$ 1, pero no fue estadísticamente significativo.



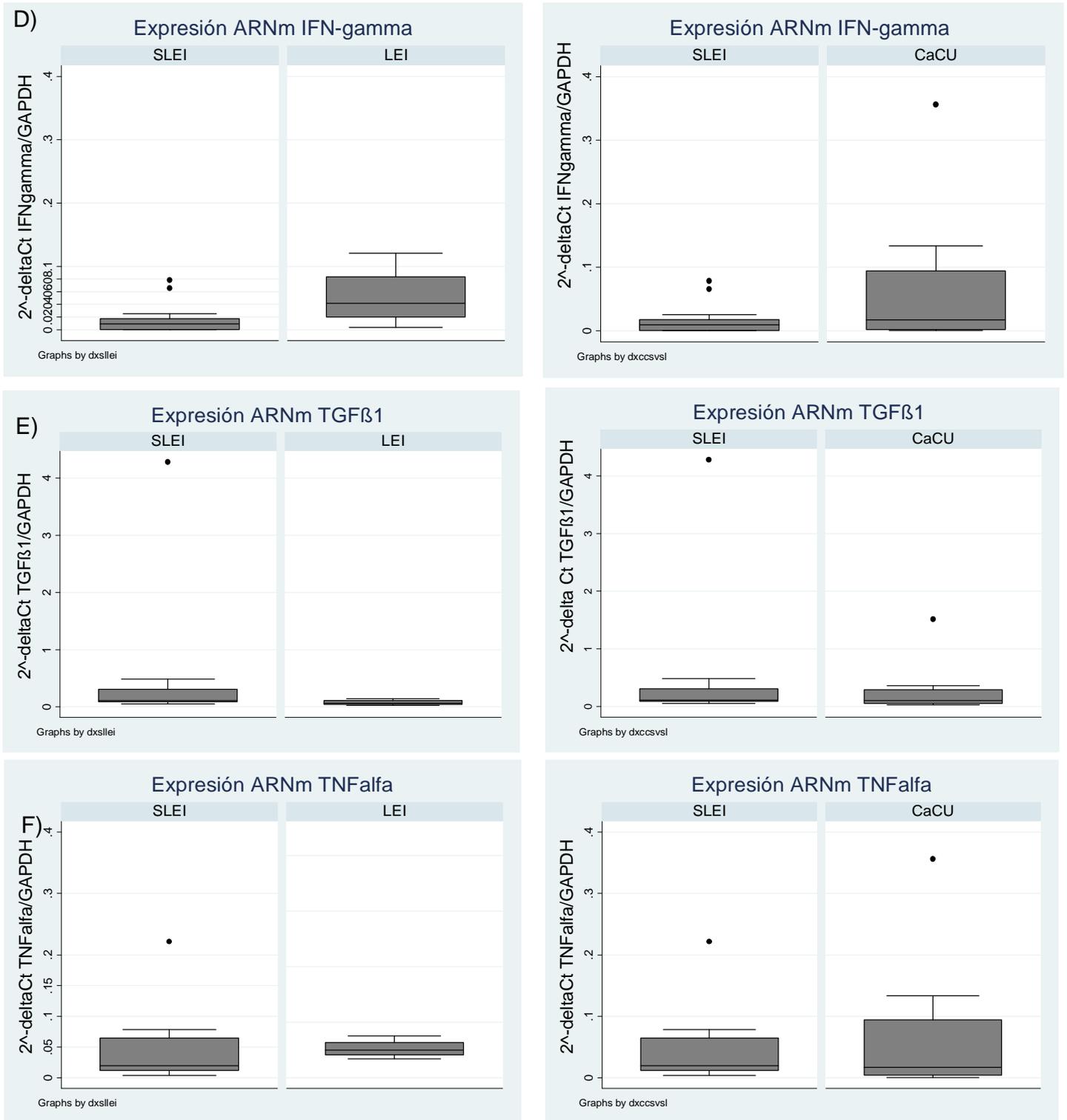
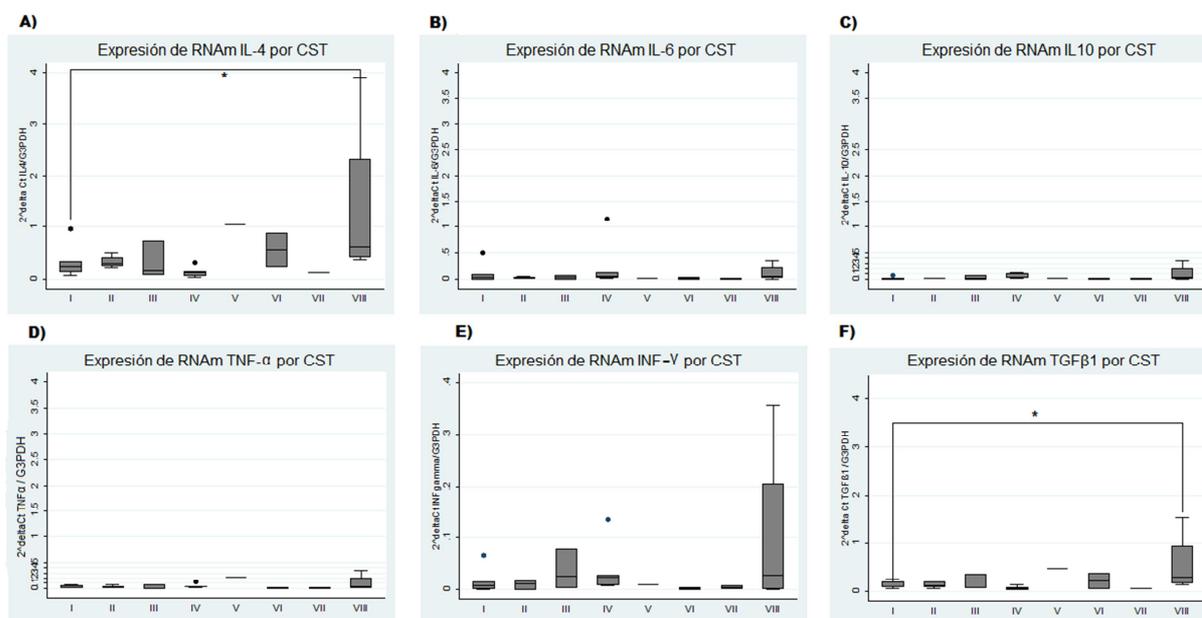


Figura 14. Niveles de expresión del ARNm de IL-10, IL-6, IL-4, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ 1 normalizados por G3PDH, en casos sin LEI vs. LEI y en casos sin LEI vs. CaCU. (A) IL-4, (B) IL-6, (C) IL-10, (D) TNF $\alpha$ , (E) IFN- $\gamma$ , (F) TGF- $\beta$ 1. \* valor p del estadístico U de Mann-Withney (p=0.04)

Por CST: Al evaluar el nivel de expresión del ARNm de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  entre los CST, se encontraron niveles elevados de la expresión de IL-4 y TGF- $\beta$ 1 relativos a GAPDH en el CST VIII dominado por *Fusobacterium spp.*, con diferencias significativas ( $p=0.05$  y  $p=0.04$ , respectivamente) (Figura 15).

Por otro lado, cuando se evaluó la correlación de los niveles de expresión de IL-10, IL-6, IL-4, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ 1 vs los índices de diversidad Shannonn y PD whole tree, no se encontró correlación estadística.



**Figura 15. Niveles de expresión del ARNm de IL-10, IL-6, IL-4, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ 1 normalizado por G3PDH. A) IL-4, (B) IL-6, (C) IL-10, (D) TNF $\alpha$ , (E) IFN- $\gamma$ , (F) TGF- $\beta$ . \*valor p para Kruskal Wallis ( $p \leq 0.05$ )**

## Discusión

Muchos factores han sido implicados en el desarrollo de CaCU incluyendo una co-infección bacteriana<sup>80</sup>. Los hallazgos principales de este trabajo muestran que la microbiota del cérvix es notoriamente distinta entre los estadios de la historia natural del CaCU. Este estudio es el primero que investiga la composición y diversidad de la microbiota en cérvix de cada estadio de la historia natural del CaCU y su asociación con el nivel de expresión de IL-10, IL-6, IL-4, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y TGF $\beta$ 1 a nivel de cérvix.

Sorprendentemente, a pesar de tener un número de muestra pequeño, se encontraron niveles significativamente mayores de las medianas de expresión del ARNm de IL-4 y TGF- $\beta$ 1 a nivel de cérvix, en el CST VIII dominado por *Fusobacterium spp.* Como era esperado, se encontró una abundancia relativa alta de especies de *Lactobacillus*, en el cérvix de mujeres sin LEI, siendo *L. crispatus* la especie más abundante en los casos VPH negativos y en el cérvix de mujeres SLEI VPH-positivas la especie *L. iners*. Dos de los CST detectados en este estudio (CST I y II, *L. crispatus* y *L. iners*), que solo se encontraron en muestras sin LEI, fueron similares a los CST reportados por Ravel *et al.*<sup>51</sup> and Smith *et al.*<sup>52</sup>. El CST V dominado por *Gardnerella vaginalis*, también fue encontrado en mujeres sanas de origen hispano en el estudio de Smith *et al.*<sup>46</sup>. La composición bacteriana del grupo SLEI coincide con lo reportado a nivel de vagina de mujeres sanas<sup>48,51,81</sup>. Asimismo, Huang *et al.* reportaron CSTs similares en la microbiota de cérvix del grupo control de su estudio (mujeres coreanas no embarazadas). Los resultados de este estudio concuerdan con los últimos estudios de microbioma vaginal en mujeres infectadas con VPH<sup>82, 83</sup>. Reportes previos de estudios de microbiota vaginal determinaron que la diversidad bacteriana en mujeres coreanas y chinas VPH positivas es más compleja que la de mujeres sanas<sup>58,81</sup>.

Estudios longitudinales en microbiota de vagina han demostrado que el *Lactobacillus crispatus* es más benéfico que *L. iners*, ya que se ha encontrado que *L. crispatus*, a diferencia de este último, tiene la capacidad de producir peróxido de hidrógeno.<sup>84</sup> Lo que puede explicar porque *L. iners* se encuentra en mayor proporción en mujeres VPH positivas y en estados de disbiosis por VIH y VHS más que *L. crispatus*<sup>85</sup>, mientras que la producción de peróxido de hidrógeno ha sido asociada a una microbiota vaginal sana<sup>86</sup>.

*Sneathia spp*, *Megasphaera elsdenii* y *Shuttleworthia satelles* fueron las bacterias más representativas en los casos de LEI y *Fusobacterium spp.* y *Sneathia spp.* en los casos de CaCU. La especie *Fusobacterium necrophorum* solo fue encontrada en los casos de cáncer. *Fusobacterium spp.*, forma parte de la microbiota comensal del microbioma intestinal y oral presentes en población humana sana<sup>87</sup>; en contraste, también ha sido

fuertemente asociado a carcinogénesis colorectal<sup>88,89</sup>. Consistente con los resultados de este estudio, *Fusobacteria spp*, incluyendo el género *Sneathia*, han sido identificadas como posibles marcadores asociados a infección por VPH en una cohorte de gemelas coreanas<sup>58</sup>.

Asimismo, *Fusobacterium* y *Atopobium vaginae* fueron previamente predominantes en la microbiota vaginal de mujeres coreanas con neoplasia cervical intraepitelial (CIN)<sup>90</sup>. Bacterias del género *Sneathia* están emergiendo como patógenos potenciales del tracto reproductivo femenino. *Sneathia spp*, antes llamada *Leptotrichia amnionii* puede formar parte de la microbiota normal del tracto genito-urinario de hombres y mujeres. Se ha documentado una correlación positiva entre la colonización con *Sneathia amnionii* y CaCU en mujeres VPH positivas<sup>91</sup>. En el presente estudio se encontró el género *Sneathia spp* principalmente en pacientes con LEI y en menor abundancia en las pacientes con CaCU. Estos resultados sugieren proponer a *Sneathia spp* como un rasgo característico de los casos de LEI VPH positivos.

Notoriamente, en el presente estudio, los resultados indican que en estados tardíos de la enfermedad *Fusobacterium spp.*, es más abundante significativamente que en estadios tempranos de la historia natural del CaCU. Las especies de *Fusobacterium*, son bacterias Gram negativas anaeróbicas que son parte de la microbiota normal oral e intestinal, algunas han sido reconocidas como patógenos oportunistas en enfermedades inflamatorias como periodontitis e inflamación intestinal crónica e incluso ha sido vinculada a cáncer colorrectal<sup>92,93</sup>. Algunos estudios han mostrado el mecanismo molecular por el cual especies de *Fusobacterium* producen efectos patogénicos. *F. nucleatum* promueve la carcinogénesis colorrectal al modular la señalización E-cadherina/ $\beta$ -catenina vía la adhesión de FadA y la inmunidad en el microambiente tumoral. Estudios epidemiológicos confirman los resultados obtenidos e identifican genes de la microbiota como virulentos<sup>94,95,96</sup>.

Por otra parte, otro estudio realizado previamente por García Carrancá y colaboradores, reportan una distribución anormal del supresor de tumor E-cadherina,

que funciona como beta-catenina, en distintos tipos de cortes histológicos del CaCU<sup>97</sup>. A pesar de que las oncoproteínas del VPH inducen cambios moleculares en el epitelio cervical, no se ha descrito ningún efecto de los VPH de alto riesgo sobre E-cadherinas y beta-cateninas.<sup>98</sup> En contraste, la bacteria *Chlamydia trachomatis* altera las uniones celulares dependientes de N-cadherinas y secuestra a beta-catenina en el epitelio cervical de mujeres<sup>99</sup>; también por medio de factores Chlamídicos con actividad tipo proteasa que degradan a Nectina-1 (molécula de adherencia en uniones adherentes) en células epiteliales transformadas por VPH<sup>100</sup>. Por lo tanto, si componentes de la microbiota del cérvix son capaces de inducir cambios en el epitelio, la presencia en abundancia de bacterias patógenas, como *Fusobacterium spp.*, puede tener un papel relevante en la patogénesis del CaCU, aunque se requiere de otros estudios para confirmar esta hipótesis.

Notablemente, *Megasphaera elsdenii* y *Shuttleworthia satelles* no han sido previamente reportadas en mujeres con LEI. No obstante, ambas especies bacterianas han sido consideradas buenos predictores de vaginosis bacteriana<sup>101</sup>, que es una disbiosis asociada a anomalías en exudados de cérvix<sup>102</sup>. Se conoce poco acerca de *Shuttleworthia satelles*, lo único reportado hasta el momento, es que ha sido aislada de la cavidad oral y de una válvula protésica de un paciente con endocarditis<sup>103</sup>.

Regresando a uno de los objetivos del presente trabajo, descubrir si existía una relación entre la microbiota del cérvix con un perfil específico de citocinas a nivel del cérvix, en casos con los distintos estadios de la historia natural del CaCU, se encontraron niveles mayores de las medianas de expresión de IL-4 y TGF- $\beta$ 1 relativos al gen endógeno GAPDH a nivel de cérvix, en el CST VIII dominado por *Fusobacterium spp.* La falla en la respuesta inmune es un evento clave en el desarrollo de CaCU; y está claro que un patrón de citocinas tipo Th2 está implicado en el microambiente tumoral<sup>104</sup>. Igualmente, varios estudios apoyan la idea de que la respuesta inmune tipo Th2 favorece la persistencia del VPH y consecuentemente el desarrollo de lesiones premalignas<sup>105, 89</sup>. Recientemente, en un estudio transversal y en un estudio de casos y controles, ha sido demostrado que varias citocinas tipo Th2 son altamente expresadas

en pacientes con LEI y CaCU, respectivamente <sup>6,9</sup>. Por otra parte, algunas bacterias han sido implicadas en el desarrollo de la respuesta inmune tipo Th2 de manera directa, como *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Streptococcus thermophilus* que inducen la producción de IL-10<sup>106</sup>. Específicamente *Chlamydia trachomatis* induce la producción de IL-10 en el tracto genital femenino inferior<sup>43</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que las Fusobacterias predominantes en los grupos con LEI y CaCU podrían estar relacionadas con la producción a nivel del cérvix de citocinas tipo Th2 y Th3, específicamente IL-4 y TGF- $\beta$ 1. No obstante, no se puede asegurar que sean las responsables de tal efecto hasta la realización de otros estudios longitudinales. En modelos de cáncer colorrectal se ha reportado la presencia de *Fusobacterium nucleatum*, y contrario a lo que sucede en otros tipos de cáncer relacionados a bacterias como cáncer gástrico, esta bacteria no exacerba colitis, ni enteritis o una carcinogénesis inflamatoria<sup>78</sup>. Lo que podría ser explicado por la producción de citocinas antiinflamatorias. El papel de *Fusobacterium nucleatum* en la generación de citocinas tipo Th2 requiere ser demostrado.

Por otro lado, en un estudio reciente se demostró que la microbiota regula la inmunidad tipo 2 a través de la inducción de Tregs ROR $\gamma$ t+ y TH17, actuando como elemento clave en el balance de la respuesta inmune en células epiteliales<sup>107</sup>. La infiltración de linfocitos T en la mucosa del cérvix aumenta de acuerdo al grado de malignidad del CaCU y se correlaciona con el infiltrado de linfocitos Foxp3+ en estados tardíos de la enfermedad. Estos linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ Tregs juegan un papel importante en la patogénesis del carcinoma de cérvix<sup>108</sup>. Por lo que la presencia de algunos miembros de la microbiota del cérvix, como *Fusobacterium spp.*, podría inducir la respuesta inmune tipo Th2 a través de Tregs ROR $\gamma$ t+, células Th17, presentes en el epitelio del cérvix<sup>109</sup>. Lo anterior genera la pregunta de si las células Th17 se pueden diferenciar a Th3. La transdiferenciación de células Th17 fue ilustrada recientemente; esto se demostró por cambios en su perfil transcripcional y la adquisición de una capacidad regulatoria potente. Distintos perfiles transcripcionales de pre y post-conversión han revelado un papel canónico del señalamiento de TGF- $\beta$ 1<sup>110</sup>. Varios estudios, incluyendo algunos de Madrid-Marina y cols, han demostrado niveles de

expresión altos del ARNm de TGF- $\beta$ 1, IL-4, e IL-10 en biopsias de pacientes con LEI y CaCU<sup>4</sup>. Similarmente, se han reportado niveles séricos altos de estas citocinas en pacientes con CaCU<sup>91</sup>. En este trabajo se encontró una asociación de las CST dominadas por *Fusobacterium spp.* con altos niveles de expresión del ARNm de IL-4 y TGF- $\beta$ 1. Además de estos pacientes, se ha reportado que infecciones orales por *Fusobacterium spp.*, potencian la expresión de IL-4 sistémica. Por lo que existe, se puede inferir una fuerte evidencia de que *Fusobacterium spp.* juega un papel importante en el desarrollo de la inmunosupresión en el microambiente caracterizado por citocinas anti-inflamatorias, como IL-4 y TGF- $\beta$ 1 en células transformadas por VPH del cérvix; no obstante, se requieren estudios epidemiológicos longitudinales extensivos para confirmar esta hipótesis.

Otra citocina Th2 implicada en la inmunosupresión en pacientes con CaCU es IL-10<sup>4</sup>. A pesar de haber encontrado niveles altos del ARNm de IL-10 en pacientes con LEI, no se encontró asociación con un perfil de microbiota específico. La fuente de producción de IL-10 puede explicarse por células tumorales, queratinocitos, macrófagos y células de Langerhans en el cérvix de mujeres con LEI y CaCU, donde su presencia ha sido demostrada por análisis inmunohistoquímico<sup>4,111</sup>. Múltiples factores contribuyen a la producción de IL-10 y TGF-  $\beta$ 1 en el cérvix de células transformadas por VPH, incluyendo proteínas del VPH, como E2 y las oncoproteínas E6/E7, que inducen un aumento en la expresión de IL-10 y TGF-  $\beta$ 1<sup>6,7</sup>.

## **Conclusión**

Con este estudio se comprobaron las hipótesis siguientes: La diversidad de la microbiota en estadios avanzados del CaCU es mayor que la encontrada en mujeres sin lesión de cérvix VPH+ y VPH-. Existen especies bacterianas específicas para cada estadio del cáncer cervicouterino. Existe una diferencia significativa en los niveles de expresión de las citocinas IL-4, TGF- $\beta$ 1, a nivel del cérvix, al agrupar por CST. Los niveles de expresión de las citocinas Th2 (IL-10) a nivel del cérvix fueron mayores en LEI, al compararlos con los encontrados en mujeres sin lesión de cérvix VPH+ y VPH-.

La diversidad de la microbiota del cérvix es mayor en estadios avanzados del CaCU como fue hipotetizado inicialmente, en el presente estudio. Se demostró una predominancia, en los casos SLEI, de especies de *Lactobacillus*: la especie *L. crispatus* (prevalente en mujeres VPH-) y *L. iners* (prevalente en mujeres VPH+), a excepción de dos muestras que tuvieron mayor número de *Gardnerella vaginalis* y *Streptococcus agalactiae*. En los casos de LEI y CaCU estuvo mayormente representada *Megasphaera Fusobacterium spp*, que incluyen *Sneathia spp*. En los casos de CaCU se reportó exclusivamente *Fusobacterium nechrophorum*. No obstante, se requieren de estudios longitudinales futuros para validar si estas bacterias tienen un papel patogénico en CaCU y proponer estas bacterias como biomarcadores microbiológicos a evaluar en las fases tempranas del CaCU.

En conclusión, este trabajo de tesis sugiere la asociación de ciertos miembros de la microbiota del cérvix, como un posible modificador del perfil de citocinas del microambiente local que condicionen el desarrollo de LEI y CaCU. Con este trabajo se abren nuevas perspectivas para el estudio del género *Fusobacterium* y su posible papel en la carcinogénesis del cérvix, ya sea modificando la respuesta inmune tipo Th17 a Th2 o por un efecto directo sobre la vía de señalización E-cadherina/ $\beta$ -catenina en células transformadas por VPH. El conocimiento generado en este estudio podrá permitir el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas, con marcadores microbiológicos para identificar pacientes en estadios tempranos con potencial para el desarrollo de CaCU.

## **Perspectivas**

Como perspectivas se espera identificar a través de estudios de metagenómica, biomarcadores bacterianos de las especies mayormente representadas en cada fase de la historia natural del CaCU, que sean útiles como herramientas diagnósticas para detectar mujeres infectadas con el VPH y mediante un estudio poblacional, identificar la

frecuencia de la presencia de biomarcadores bacterianos en mujeres infectadas con el VPH.

### **Limitaciones del estudio**

Dado el diseño del estudio, no se puede establecer causalidad, entre la diversidad y composición de la microbiota del cérvix como un factor de riesgo para el desarrollo de lesión premaligna en cérvix y CaCU. La calidad y cantidad de ARN extraído de las muestras de cérvix de los casos evaluados, fue una limitante para el análisis de expresión de citocinas a nivel local.

### **Consideraciones éticas y de bioseguridad**

El estudio transversal al que está anidado este proyecto contó con la aprobación de las comisiones de Investigación, Bioseguridad y de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública y del Instituto Nacional de Cancerología. En el consentimiento informado las participantes autorizaron al grupo de investigación usar las muestras del banco para otras investigaciones (el formato de este documento puede ser consultado en el anexo 1). Los formatos de los consentimientos informados, de la carta de aprobación de la comisión de ética en investigación y de bioseguridad del proyecto madre al que estuvo anidado este estudio pueden ser consultados en el Anexo 2.

### **Recursos materiales y financiamiento**

El proyecto contó con apoyo para su realización de CONACyT, a través del proyecto SEP CB-2011-01-169552 bajo el título "Microbioma de cérvix en los diferentes estadios que llevan al desarrollo de cáncer cervicouterino". Se contó con la beca mixta otorgada a los alumnos de los posgrados de calidad número 2976418945.

## Anexo 1.

### Consentimiento informado



#### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRASANGUÍNEA Y PARA TOMA DE MUESTRA DE EXUDADO CERVICAL

FECHA: / / / / / / / / / /

Día mes año

En México mueren muchas mujeres por Cáncer cérvicouterino y cada año se reportan másde 11,000 nuevos casos; lo cual sugiere que existe un factor genético en la población que la haga susceptible a esta enfermedad. El Instituto Nacional de Salud Pública está realizando un estudio titulado "Polimorfismos de la región reguladora del gen de Interleucina 10 y su asociación con la infección del virus del papiloma humano y el cáncer cérvicouterino" con el fin de identificar factores genéticos de susceptibilidad en la población mexicana.

En este estudio se está invitando a mujeres que acuden a consulta en el Centro de Atención de la Mujer referidas de centros de atención primaria con un diagnóstico presuntivo que será confirmado ó descartado por el ginecólogo colposcopista. En caso de aceptar participar en el estudio mediante la firma de esta carta de consentimiento se le pedirá lo siguiente:

- a) Responder a un cuestionario de 42 preguntas sobre características demográficas e historia reproductiva que le hará el profesional encargado de toma de muestra en un tiempo aproximado de 15minutos. La información que usted dé será estrictamente confidencial y de suma importancia para el logro de los objetivos del presente estudio. Cuando esta información se emplee en reportes científicos, fueron resumidos de tal forma, que no aparezca algún nombre o forma alternativa de identificación.

- b) Permitir la toma de muestra sanguínea (2 tubos de 7 ml = dos cucharaditas) por el profesional especializado encargado, con la que nos permitirá extraer el ADN para analizar los polimorfismos del gen de IL-10, el ARN para analizar la expresión del ARNm de IL-10 y suero para medir el nivel de proteína de IL-10 y establecer relaciones con el diagnóstico que el ginecólogo colposcopista le realice. Por otro lado, esta muestra servirá para la creación de un banco de ADN, ARN y suero que nos permitirá en un futuro realizar otras investigaciones de importancia para la salud de la población en general. La toma de sangre será tomada con material nuevo y estéril y se llevará a cabo en el consultorio del Centro de Atención para la Salud de la Mujer, así como la aplicación del cuestionario.
- c) Permitir la toma de muestra de exudado de cérvix por el ginecólogo colposcopista en un tiempo aproximado de 10 minutos. En este procedimiento le tomarán muestra del canal endocervical con un cepillo (citobrush) y la colocarán en un tubo con medio de conservación para realizar posteriormente la prueba de detección del Virus del Papiloma Humano por PCR y la extracción de ARN para el análisis de expresión de IL-10 en cérvix. Adicionalmente el ginecólogo le tomará muestra de esta zona para realizar un frotis o extendido en lámina para la citología o Papanicolau y le hará una colposcopia adicionándole ácido acético para detectar tempranamente cualquier tipo de lesión que tenga que ser tratada. El diagnóstico colposcópico lo realizará el ginecólogo colposcopista al momento de la consulta, la citología será enviada para su análisis patológico.

#### RIESGOS Y MOLESTIAS POTENCIALES:

La toma de muestra de exudado cervical es algo incómodo, pero el doctor(a) que realiza este procedimiento, lo hace muy rápido, limitándole las posibles molestias, en beneficio de su salud.

La toma de muestra de sangre puede ser un poco dolorosa y en ocasiones puede dejar un moretón alrededor del sitio de la toma. Sin embargo, la persona encargada de tomarle la muestra es un profesional con experiencia y tratará de que esto no suceda.

En caso de cualquier problema relacionado con la toma de las muestras, personal del Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos, le atenderá sin costo alguno.

#### BENEFICIOS POTENCIALES:

Los resultados de este estudio permitirán conocer si usted tiene una infección por el Virus del Papiloma Humano o algún tipo de lesión del cuello uterino que requiera de tratamiento oportuno.

En la siguiente cita de control luego de la toma de muestra, el ginecólogo colposcopista del Centro de Atención para la Salud de la Mujer, le dará a cada uno de las pacientes el diagnóstico colposcópico. El resultado de la prueba de PCR para VPH y de la citología, se dará al paciente un mes después de la toma de muestra en una de las citas de control. Los resultados se darán por escrito, con copia en la historia clínica de cada uno de las pacientes. En caso de que los resultados muestren que usted tiene alguna lesión, el personal médico especializado del Centro de Atención para la Salud de la Mujer donde usted es atendida, la orientará y le brindará el mejor esquema para su tratamiento.

#### PARTICIPACIÓN:

Su participación es VOLUNTARIA y por lo tanto, puede dejar de contestar alguna pregunta, suspenderla entrevista o retirarse del estudio en cualquier momento. Las muestras de sangre y de exudado de cérvix que usted está donando fueron procesadas para obtener ADN, ARN y suero. Cada una de las muestras será etiquetada con un código cuya identidad sea confidencial y fueron almacenadas en los bancos del laboratorio 4 planta baja del Centro de investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública. En caso de que usted decida retirarse del estudio, esto no afectará de ninguna manera la calidad y cantidad de atención médica que recibe de parte del Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos". No es posible en caso de retiro del estudio, devolver la muestra que usted donó, dado que la muestra ya pudo haber sido procesada, sólo que no se incluirá en el estudio sin su autorización.

Todos los gastos que se generen en la presente investigación fueron cubiertos por el Instituto Nacional de Salud Pública y los Servicios de Salud de Morelos y se le garantiza confidencialidad de la información que usted muy amablemente nos brinde.

Para cualquier aclaración o duda respecto a este estudio favor de llamar por cobrar al teléfono (777)3293056 con el Dr. Vicente Madrid, responsable de la investigación en el Instituto Nacional de Salud Pública en la ciudad de Cuernavaca.

Para cualquier duda derivada de la toma de muestra, favor de llamar por cobrar al teléfono (777)3101438 con el Dr. Javier Salgado, responsable de la investigación en el Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos en la ciudad de Cuernavaca.

Para cualquier aclaración o duda sobre sus derechos como participante en este estudio de investigación, puede comunicarse con la Dra. Julieta Ivone Castro, Presidenta de la Comisión de Ética del Instituto Nacional de

Salud Pública al teléfono (777)329-30-00 Extensión 7424, de lunes a viernes de 9:00a17:00hrs.

### AUTORIZACIÓN

Leído lo anterior, acepto participar en el estudio descrito y a que los propósitos de este han sido explicados a mi satisfacción. Queda copia de esta forma de consentimiento, registrada en la Historia Clínica del paciente

del Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos.

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Testigo1 \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Parentesco con el paciente: \_\_\_\_\_

Testigo2 \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Parentesco con el paciente: \_\_\_\_\_

Además, autorizo que mi muestra de sangre sea guardada en un banco de muestras en el Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la responsabilidad del Investigador Responsable del proyecto, el Dr. Vicente Madrid Marina y sea utilizada en otros proyectos de investigación diferentes a este”.

Sí acepto

No acepto

<p style="text-align: center;"><b>Comisión de Ética</b> <b>Instituto Nacional de Salud Pública</b> Versión Aprobada:</p>
--

## Anexo 2. Cartas de aprobación de las Comisiones de Bioseguridad, Ética en Investigación e Investigación del Proyecto Madre al que estuvo anidado el presente estudio

Carta Comisión de Bioseguridad



CB10-041.

Cuernavaca, Mor., a 21 de Enero del 2010.

CB: 806 - CI: 814

**Dr. Vicente Madrid Marina**  
**Responsable de Proyecto**  
**CISEI-INSP**  
**Presente**

Por medio del presente informo a usted que el dictamen de la Comisión de Bioseguridad para la incorporación de dos co-investigadores, los M. en C. Margarita Bahena Román y Alfredo Lagunas Martínez en el proyecto de investigación titulado: "Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres procedentes del Estado de Guerrero" es: **EXENTO DE REVISIÓN.**

Atentamente,

  
**Dr. Salvador F. Villalpando Hernández**  
**Presidente de la Comisión**  
**de Bioseguridad-INSP**

ccp. Dr. Eduardo Lázcano Ponce.- Presidente de la Comisión de Investigación.-Presente.  
Dra. Julietta Ivonne Castro Romero.- Presidenta de la Comisión de Ética.-Presente.

Col. Santa María Ahuacalilán  
62508 Cuernavaca, Morelos  
México

Tel-Fax:01 (777) 3293000 ext 7204  
Secretaría: 7204

e-mail: svillal@insp.mx

# Carta Comisión de Ética



INSTITUTO NACIONAL DE  
SALUD PÚBLICA

Avenida Universidad 855,  
Colonia Santa María Ahuacatlilán  
62100 Cuernavaca, Morelos, México

Teléfono: +52 (777) 329 30 00 Ext. 2465  
Email: jcastro@insp.mx  
web: www.insp.mx

**COMISIÓN DE ÉTICA**  
Dra. Julieta Ivone Castro Romero  
Presidenta

Cuernavaca, Mor., 18 de enero, 2010.  
CI: 814,

**Vicente Madrid Marina**  
Investigador principal  
Presente

Estimado investigador,

Por medio del presente me permito informar a usted que el dictamen de la Comisión de Ética al addendum de su estudio titulado: ***"Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres procedentes del Estado de Guerrero"*** fue:

### ***Exento de revisión***

Para registrar a los M. en C. Margarita Bahena Román y Alfredo Lagunas Martínez como co-investigadores del presente estudio.

Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a esta Comisión, previo a su implementación, utilizando el sistema de *Modificaciones a Proyectos en Desarrollo* que se encuentra dentro del sistema SIID. Si Usted tiene dudas sobre el registro de modificaciones menores, favor de comunicarse con esta Comisión para su consideración.

Atentamente



## Carta Comisión de Investigación



### Instituto Nacional de Salud Pública Comisión de Investigación

No. de Ref. 814.

CI-231.

Cuernavaca, Mor., a 5 de junio del 2009.

**Dr. Vicente Madrid Marina**  
Responsable de Proyecto  
CISEI-INSP  
Presente

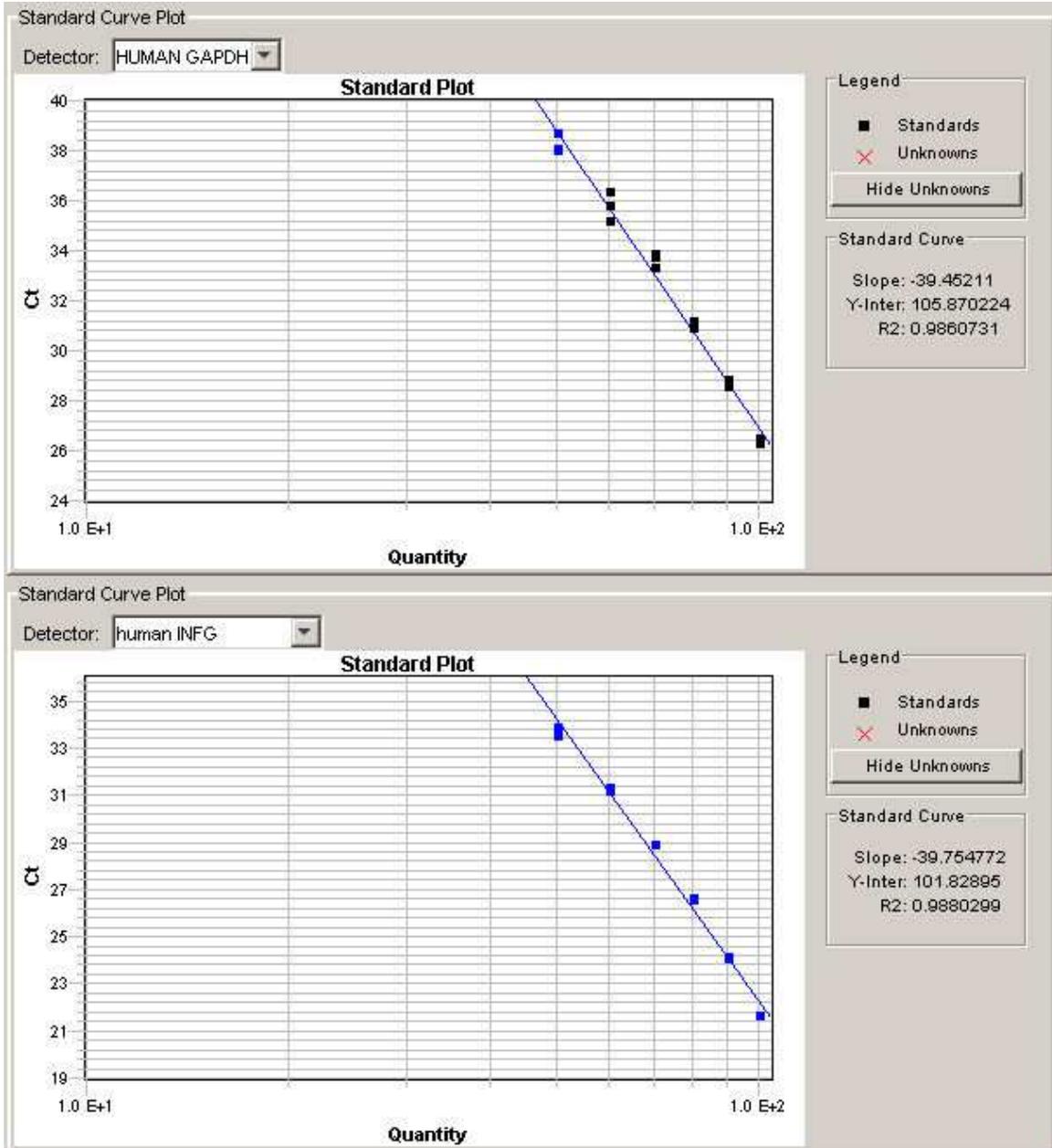
Por medio del presente informo a usted que se registró la aprobación de la Comisión de Bioseguridad del proyecto de investigación titulado: **“Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres procedentes del estado de Guerrero”**; cumpliendo con los requisitos para la **Aprobación** definitiva de la Comisión de Investigación.

Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

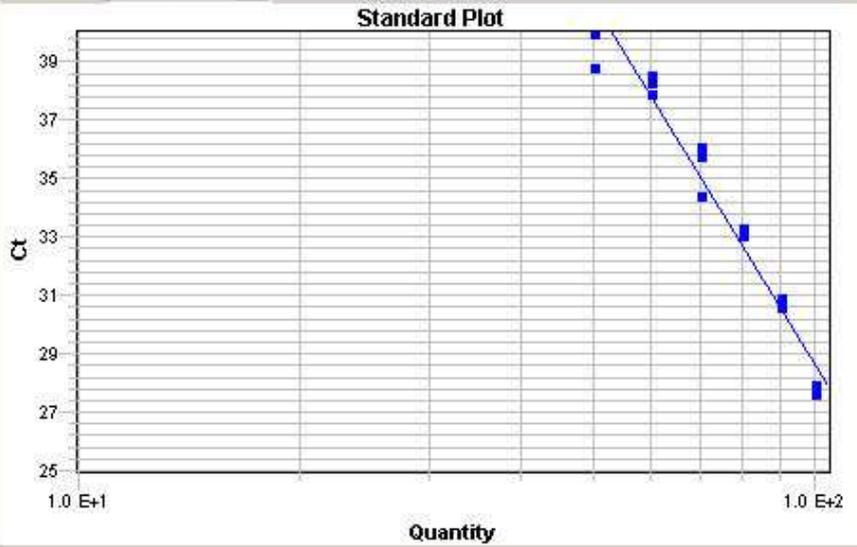
**Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce**  
Presidente de la Comisión  
de Investigación-INSP

### Anexo 3. Rangos dinámicos para el análisis de expresión de citocinas a nivel del cérvix



Standard Curve Plot

Detector: IL-2HUMANO



Legend

- Standards
- × Unknowns

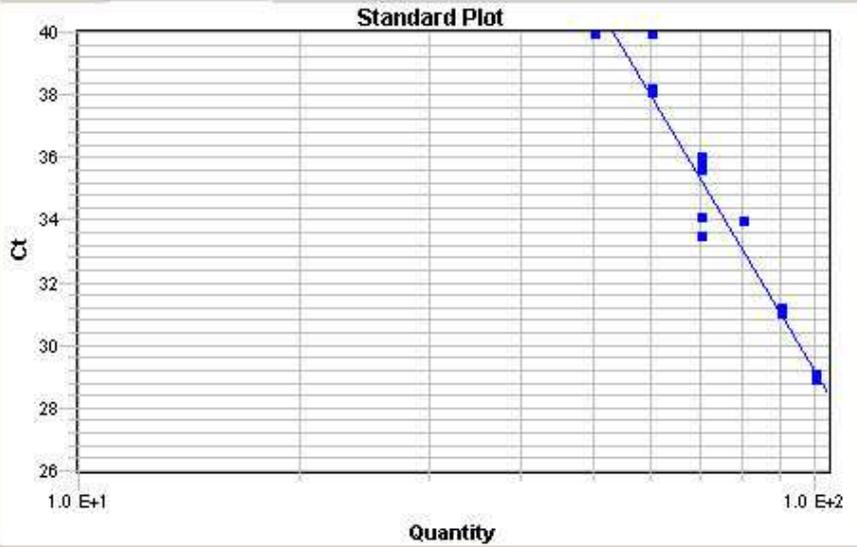
Hide Unknowns

Standard Curve

Slope: -41.16803  
Y-Inter: 111.01848  
R2: 0.95205265

Standard Curve Plot

Detector: HUMAN IL-10



Legend

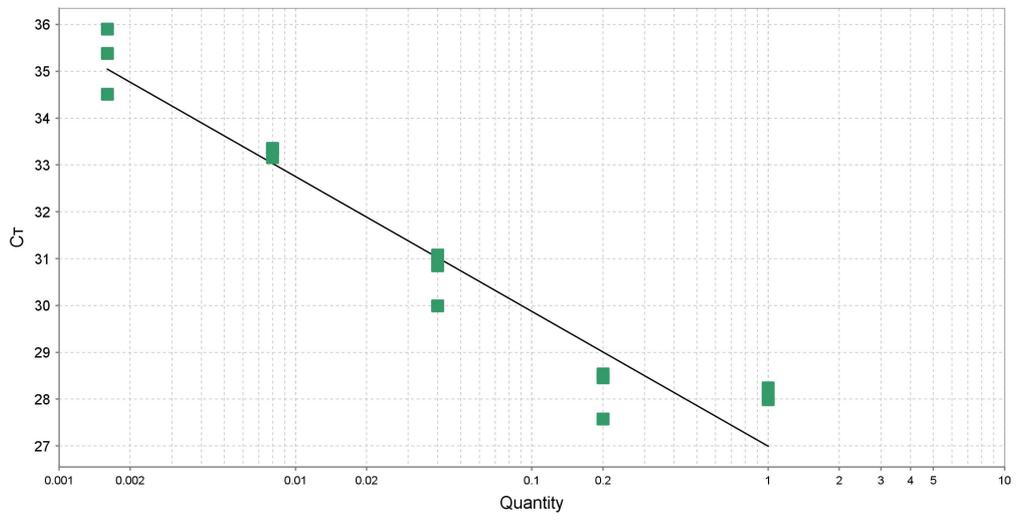
- Standards
- × Unknowns

Hide Unknowns

Standard Curve

Slope: -39.461166  
Y-Inter: 108.12488  
R2: 0.95006514

Standard Curve



## Referencias

---

1 INEGI 2012. Estadísticas de mortalidad. Cubos dinámicos y CONAPO 2012. Proyecciones de la población de México 2012-2050.

2 Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003, 348:518-27.

3 Insinga RP, Perez G, Wheeler CM, Koutsky LA, Garland SM, Leodolter S, et al. Incident cervical VPH infections in young women: transition probabilities for CIN and infection clearance. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20, 287-296.

4 Bermúdez-Morales VH, Burguete AI, Gutierrez ML, Alcocer-Glez JM, Madrid-Marina V. Correlation between IL-10 expression and Human Papillomavirus infection in cervical cancer. A Mechanism for Immune Response Escape. *Cancer Investig* 2008;26:1037-43.

5 Alcocer-González JM, Berumen J, Tamez-Guerra R, Gariglio P, Hernández-Pando R, Bermúdez-Morales VH, et al. In Vivo Expression of Immunosuppressive Cytokines in Human Papillomavirus- Transformed Cancer Cells. *Viral Immunology* 2006;19(3):481-91.

6 Peralta-Zaragoza O, Bermúdez-Morales V, Gutiérrez-Xicotencatl L, Alcocer-González J, Recillas-Targa F, Madrid-Marina V. Human papillomavirus-16 E6 and E7 proteins induce activation of human TGF- $\beta$ 1 basal promoter in epithelial cells throughout a Sp1 recognition sequence. *Viral Immunology* 2006;19(3):468-80.

7 Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Moreno J, Alcocer-González JM, Madrid-Marina V. IL-10 expression is regulated by VPH E2 protein in cervical cancer cells. *Molecular Medicine Reports* 2011; 4(2): 369-375

8 Torres-Poveda K, Burguete-García AI, Cruz M, Martínez-Nava GA, Bahena-Román M, Ortiz-Flores E, et al. The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. *Infect Agent Cancer*. 2012; 7(1):32.

9 Torres-Poveda K, Burguete-García AI, Bahena-Román M, Méndez-Martínez R, Zurita A, López-Estrada G, et al. Risk Allelic Load in Th2 and Th3 Cytokines gene as Biomarker of Susceptibility to cervical cancer. Submitted *BMC Cancer*, 2015.

- 
- 10 Doerflinger S Y, Throop A L, and. Herbst-Kralovetz M.M, Bacteria in the Vaginal Microbiome Alter the Innate Immune Response and Barrier Properties of the Human Vaginal Epithelia in a Species-Specific Manner, *JID* 2014:209
- 11 Hooper L V, Littman DR, Macpherson A J, Interactions between the microbiota and the immune system, *Science* 2012;336:1268
- 12 Peghini BC, Abdalla DR, Macedo-Barcelos AC, Lombardi-teodoro LdGV, Candido-Murta EF, Antoniazzi-Michelin M, Local cytokine profile of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia, *Human Immunology* 2012; 73:920–6
- 13 Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol* 2015;1(4):505-27.
- 14 International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Accessed 27 July 2015.
- 15 INEGI, Geografía del cáncer femenino, como causa de muerte, comunicado social num. 267/11 Aguascalientes AGS. 2011
- 16 INEGI 2012. Estadísticas de mortalidad. Cubos dinámicos y CONAPO 2012. Proyecciones de la población de México2012-2050
- 17 Summary Report, ICO Information Centre on VPH and Cancer [Internet].[citado 31 de enero de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.VPHcentre.net/summaryreport.php>
- 18 Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Brunie L et al.; Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia; *Vaccine* 2008; (26S) K1–K16
- 19 Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9.
- 20 Rodriguez AC, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Wacholder S. Longitudinal, prospective study of type-specific carcinogenic VPH infections over 7 years in Guanacaste, Costa Rica. Proceedings of the 24th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop, Beijing, China 2007. Abstracts book. Abstract 7B-02.

---

21 Peralta-Rodríguez R, Romero-Morelos P, Villegas-Ruíz V, et al. Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: meta-analysis. *Infect Agent Cancer* 2012;7(1):34.

22 Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. The male role in cervical cancer. *Salud Publica Mex* 2003;45(Suppl 3):S345–53

23 Hogewoning CJ, Bleeker MC, van Den Brule AJ, Voorhorst FJ, Snijders PJ, Berkhof J, et al. Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial. *Int J Cancer* 2003; 107:811–6.

24 Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G. Risk factors for human papillomavirus exposure, and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine* 2008;19;26(Suppl 11):L16-36.

25 Vaccarella S, Herrero R, Dai M, et al. Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC VPH prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(11):2148-2153

26 Castellsague X, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, de Sanjose S, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* 2002; 346:1105–12.

27 De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1):17-27.

28 Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 30, S5(0):F55-F70.

29 Martínez-Nava GA, Torres-Poveda K, Martínez-Lagunas A, Bahena-Román M, Zurita-Díaz MA, Ortíz-Flores E, García-Carranca A, Madrid-Marina V, Burguete-García AI. Cervical cancer associated akna promoter polymorphism affects AKNA expression levels. *Genes & Immunity* 2015; 16: 43-53.

30 Perales G, Burguete-García, Dimas J, Bahena-Román M, Bermúdez-Morales VH, Moreno J et al., A polymorphism in the AT-hook motif of the Transcriptional regulator AKNA is a risk factor for cervical cancer, *Biomarkers* 2010; 15(5): 470–4

31 Chen D, Gyllensten U. Systematic investigation of contribution of genetic variation in the HLA-DP region to cervical cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2014; 35 (8):1765-69

32 Louie KS, Castellsague X, de Sanjose S, Herrero R, Meijer CJ, Shah K, et al. Smoking and passive smoking in cervical cancer risk: pooled analysis of couples from

---

the IARC multicentric case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20(7):1379- 90.

33 Abbate EA, Berger JM, and Botchan MR, The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2, *Genes Dev.* 2004 18: 1981-96

34 Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical VPH infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(1):11-22.

35 Reigosa Yániz Aldo R. Sobre el Virus del Papiloma Humano (VPH), su historia natural y diagnóstico. *Salus* [revista en la Internet]. 2012 Abr [citado 2014 Feb 02]; 16(1): 3-4. Disponible en: [http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-71382012000100002&lng=es](http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382012000100002&lng=es).

36 Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S, Human papillomavirus and cervical cáncer, *Lancet* 2007; 370: 890–90.

37 Hibma MH, The immune response to Papillomavirus during infection persistence and regression, *The Open Virology Journal*, 2012; 6:241-8.

38 Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V et al., TLR9 Expression and Function Is Abolished by the cervical Cancer-Associated Human Papillomavirus Type 16, *J Immunol* 2007;178;3186-3197

39 Díaz-Benítez C, Navarro-Fuentes K, Flores-Sosa J, Juárez-Díaz J, Uribe-Salas F, Román-Basaure E, et al. CD3 $\zeta$  Expression and T Cell Proliferation are Inhibited by TGF- $\beta$ 1 and IL-10 in Cervical Cancer Patients. *J Clin Immunol.* 2009; 29(4):532-44.

40 Malefyt R d W, Haanen J, Spits H, Roncarolo M- G, Vedele A, Figdor C et al., Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression, *J. Exp. Med* 1991; 174(4):915-24.

41 Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB & Oldstone MBA, Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo, *Nat Med*, 2006 12(11):1301-9.

42 Donato KA, Gareau MG, Jing Y, Wang J y Sherman PM., *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signaling, *Microbiology* 2010, 156:3288-97.

43 Marks E, Tam MA, Lycke NY, The Female Lower Genital Tract Is a Privileged Compartment with IL-10 Producing Dendritic Cells and Poor Th1 Immunity following

---

Chlamydia trachomatis Infection. PLoS Pathog 2010; 6(11): e1001179. doi: 10.1371/journal.ppat.1001179

44 Ley RE, Knight R, Gordon JI. The human microbiome: Eliminating the biomedical/environmental dichotomy in microbial ecology. Environ Microbiol 2007; 9(1):3-4.

45 Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS et al. Evolution of Mammals: Their Gut Microbes. Science. 2008 Jun 20; 320(5883):1647-51.

46 Brooks GF. Microbiología. Editorial Manual Moderno. 19ª Edición. México 2008.

47 Lora V, Hooper, Dan R, Littman, Andrew J, Macpherson, Interactions between the microbiota and the immune system, Science. 2012; 336(6086):1268-73.

48 Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UM, Zhong X et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota, J. Sci Transl Med 2012; 2;4(132):132ra52.

49 Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. BMC Genomics 2010; 11:488..

50 Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR and Forney LJ, Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation independent methods, Microbiology 2004; 150:2565–73.

51 Ravel J, Gajera P, Abdob Z, Schneiderc GM, Koeniga SSK, McCullea SL et al., Vaginal microbiome of reproductive-age women, PNAS 2011; 108 (1): 4681.

52 Smith B.C., McAndrew T., Chen Z., Harari A., Barris D.M., Viswanathan S et al, The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization, PLoS ONE 2012; 7 (7):e40425

53 Drell T, Lillsaar T, Tummeleht L, Simm J, Aaspõllu A, et al. Characterization of the Vaginal Micro- and Mycobiome in Asymptomatic Reproductive-Age Estonian Women. PLoS ONE 2013; 8(1):e54379.

54 Schellenberg JJ, Links MG, Hill JE, Dumonceaux TJ, Kimani J, Jaoko W et al.; Molecular Definition of Vaginal Microbiota in East African Commercial Sex Workers, Appl Environ Microbiol. 2011; 77(12):4066-74.

55 Rodriguez-Cerdeira C, Sanchez-Blanco E, and Alba A, Evaluation of Association between Vaginal Infections and High-Risk Human Papillomavirus Types in Female Sex Workers in Spain, ISRN Obstet Gynecol. 2012; 2012:240190.

---

56 Martin DH, Zozaya M, Lillis RA, Myers L, Nsuami MJ, and Ferris JM, Unique Vaginal Microbiota That Includes an Unknown Mycoplasma-Like Organism Is Associated With *Trichomonas vaginalis* Infection, *JID* 2013:207.

57 Huang Y-E, Wang Y, He Y, Ji Y, Wang L-P, Sheng H-F et al. Homogeneity of the vaginal microbiome at the cervix, posterior fornix, and vaginal canal in pregnant Chinese women, *Microb Ecol.* 2015 Feb;69(2):407-14.

58 Lee JE, Lee S, Lee H, Song YM, Lee K, Han MJ, Sung J, Ko G. Association of the Vaginal Microbiota with Human Papillomavirus Infection in a Korean Twin Cohort. *PLoS One* 2013; 8(5):e63514.

59 Craig L. Maynard<sup>1</sup>, Charles O. Elson<sup>2</sup>, Robin D. Hatton<sup>1</sup> & Casey T. Weaver, Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system *Nature* 2012 (489): 231.

60 Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EMM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(6):312-22.

61 Rodicio M de R y Mendoza M del C, Capítulo 11: Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología y aplicaciones en microbiología clínica, *Puesta al día en métodos microbiológicos para el diagnóstico clínico* 2004.

62 Fabrice A, Didier R Exploring Microbial Diversity Using 16S rRNA High-Throughput Methods. *J Comput Sci Syst Bio* 2009; 2: 074-092.

63 Faith DP, Reid CAM y Hunter J, Integrating Phylogenetic Diversity, Complementarity, and Endemism for Conservation Assessment, *Conservation Biology* 2004; 18(1):255-61.

64 Andrés Baselga, Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity, *Global Ecol. Biogeogr.* (2010) 19, 134–143

65 Products - GS Junior System: 454 Life Sciences, a Roche Company [Internet]. [citado 12 de junio de 2014]. Recuperado a partir de: <http://454.com/products/gj-junior-system/>.

---

66 Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG et al, Conducting a Microbiome Study, *Cell*, 2014; 158( 2): 250-262.

67 Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Backhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *Plos One* 2008; 3(7):e2836.

68 Nossa CW, Oberdorf WE, and Pei Z, Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome, *World J Gastroenterol*. Sep 7, 2010; 16(33): 4135–4144

69 Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA et. al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437:376–80.

70 Girke T, FASTQ Quality Plots, R: A language and environment for statistical computing . R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL 05-Dec-13 R Core Team (2013).

71 Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK et al.; QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nature Methods* 2010;7(5):335-6

72 Hamady M, y Knight R., Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges, *Genome Research* 2009 (19):1141-1152.

73 Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R, PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 2010; 26:266-267.

74 DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microb* 72(7): 5069-5072.

75 Faith DP, Reid CAM y Hunter J, Integrating Phylogenetic Diversity, Complementarity, and Endemism for Conservation Assessment, *Conservation Biology* 2004; 18(1)255-61.

76 Lozupone, C.; Knight, R., UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities, *AEM* 2005; 71 (12): 8228–35.

77 Vazquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R. Emperor: A tool for

---

visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience* . 2013; 2(1):16.

78 Application note, Cytokine Profiling by qRT-PCR, [http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CC0QFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.sabiosciences.com%2Fnewsletter%2FPathways6-AppNote-Cytokine.pdf&ei=6OuTVbHyD5a1yASVyrigBQ&usg=AFQjCNEOZbMA8jYpL9-8dVkDtJ6FNyUeCg&sig2=y8NveSW\\_OL3u8uDdCSPZTw&bvm=bv.96952980,d.aWw&cad=rja](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CC0QFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.sabiosciences.com%2Fnewsletter%2FPathways6-AppNote-Cytokine.pdf&ei=6OuTVbHyD5a1yASVyrigBQ&usg=AFQjCNEOZbMA8jYpL9-8dVkDtJ6FNyUeCg&sig2=y8NveSW_OL3u8uDdCSPZTw&bvm=bv.96952980,d.aWw&cad=rja)

79 Schmittgen, TD and Livak KJ, Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3(6):1101-8

80 Shew ML, Ermel AC, Weaver BA, Tong Y, Tu W, Kester LM, et al. Association of *Chlamydia trachomatis* infection with redetection of human papillomavirus after apparent clearance. *J Infect Dis* 2013; 208(9): 1416-21.

81 Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P et al., Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women, *ISME Journal* 2007; 1:121–33.

82 Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2013;13:271.

83 Lee JE, Lee S, Lee H, Song YM, Lee K, Han MJ, Sung J, Ko G. Association of the Vaginal Microbiota with Human Papillomavirus Infection in a Korean Twin Cohort. *PLoS One* 2013; 8(5):e63514.

84 Borgdorff H, Tsivtsivadze E, Verhelst R, Marzorati M, Jurriaans S, Ndayisaba GF, et al. Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women. *ISME J* 2014;8(9):1781-93.

85 van de Wijkert JH, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H, et al. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One* 2014;9(8):e105998.

86 Dols JA, Reid G, Kort R, Schuren FH, Tempelman H, Bontekoe TR, et al. PCR-based identification of eight *Lactobacillus* species and 18 hr-VPH genotypes in fixed cervical samples of South African women at risk of HIV and BV. *Diagn Cytopathol* 2012;40(6):472-7.

- 
- 87 Sagata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, et al. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based in seven mouth surfaces tonsil, throat and stool samples. *Genome Biol* 2012; 13(6):R42.
- 88 Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 2013;14(2):195-206.
- 89 Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 2013;14(2):207-15.
- 90 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.e1-9.
- 91 Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 2011;13(2):25-36.
- 92 Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012;22(2):292-8.
- 93 Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012;22(2):299-306.
- 94 Ahn J, Sinha R, Pei Z, Dominianni C, Wu J, Shi J, et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2013;105(24):1907-11.
- 95 Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, et al. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2014;74(5):1311-8.
- 96 Burns MB, Lynch J, Starr TK, Knights D, Blekhman R. Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment. *Genome Med* 2015;7(1):55.
- 97 Rodríguez-Sastre MA, González-Maya L, Delgado R, Lizano M, Tsubaki G, Mohar A, et al. Abnormal distribution of E-cadherin and beta-catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2005;97(2):330-6.

- 
- 98 Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al. Down-regulation of Ecadherin is closely associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but not with high-risk human papillomavirus (VPH) or disease outcome in cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006;27(3):215-23.
- 99 Prozialeck WC, Fay MJ, Lamar PC, Pearson CA, Sigar I, Ramsey KH. Chlamydia trachomatis disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequesters beta-catenin in human cervical epithelial cells. *Infect Immun* 2002;70(5):2605-13.
- 100 Sun J, Schoborg RV. The host adherens junction molecule nectin-1 is degraded by chlamydial protease-like activity factor (CPAF) in Chlamydia trachomatis-infected genital epithelial cells. *Microbes Infect* 2009;11(1):12-9.
- 101 Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, Hallén A, Fredlund H, Jensen JS, et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age-sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One* 2013;8(4):e60670
- 102 Caixeta RC, Ribeiro AA, Segatti KD, Saddi VA, Figueiredo Alves RR, Dos Santos Carneiro MA et al. Association between the human papillomavirus, bacterial vaginosis and cervicitis and the detection of abnormalities in cervical smears from teenage girls and young women. *Diagn Cytopathol* 2015 Jul 14. doi: 10.1002/dc.23301.
- 103 Shah NB, Suri RM, Melduni RM, Patel R, Kommedal O, Saebø O, et al. Shuttleworthia satelles endocarditis: evidence of non-dental human disease. *J Infect* 2010;60(6):491-3.
- 104 Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, Burguete-García AI, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, et al. Role of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in local immunosuppression in VPH-associated cervical neoplasia. *World J Clinical Oncology* 2014; 5(4):753-63.
- 105 Feng Q, Wei H, Morihara J, Stern J, Yu M, Kiviat N, et al. Th2 type inflammation promotes the gradual progression of VPH-infected cervical cells to cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2012;127(2):412-9.
- 106 Latvala S, Miettinen M, Kekkonen RA, Korpela R, Julkunen I. Lactobacillus rhamnosus GG and Streptococcus thermophilus induce suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene expression directly and indirectly via interleukin-10 in human primary macrophages. *Clin Exp Immunol* 2011;165(1):94-103.
- 107 Ohnmacht C, Park JH, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, et al. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR $\gamma$ t+ T cells. *Science* 2015 Jul 9. pii: aac4263.

- 
- 108 Chen ZF, Xu Q, Ding JB, Zhang Y, Du R, Ding Y. CD4+CD25+Foxp3+ Treg and TGF-beta play important roles in pathogenesis of Uygur cervical carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2012;33(5):502-7.
- 109 Punt S, van Vliet ME, Spaans VM, de Kroon CD, Fleuren GJ, Gorter A, et al. FoxP3(+) and IL-17(+) cells are correlated with improved prognosis in cervical adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64(6):745-53.
- 110 Gagliani N, Vesely MC, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* 2015; 523(7559):221-5.
- 111 Prata TT, Bonin CM, Ferreira AM, Padovani CT, Fernandes CE, Machado AP, et al. Local immunosuppression induced by high viral load of human papillomavirus: characterization of cellular phenotypes producing interleukin-10 in cervical neoplastic lesions. *Immunology* 2015 . doi: 10.1111/imm.12487.