



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Microbioma cervical y su relación con la transformación epitelial cervical en el lobo marino de California (*Zalophus californianus*)

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Biológicas

Presenta:

Juan Carlos Pereida Aguilar

Dirigido por:

Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Karina Alethya Acevedo Whitehouse
Presidente

Firma

Fausto Arellano Carbajal
Secretario

Firma

Roberto Carlos Álvarez Martínez
Vocal

Firma

Etzel Garrido Espinosa
Suplente

Firma

Rolando Tenoch Bárcenas Luna
Suplente

Firma

Dra. Elizabeth Elton Puente
Director de la Facultad

Dra. en C. Ma. Guadalupe Flavia Loarca
Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.

Fecha (será el mes y año de aprobación del Consejo Universitario)

RESUMEN

En humanos es conocida la asociación entre las alteraciones en la microbiota, o disbiosis, y enfermedades crónicas como el asma, obesidad, enfermedades inflamatorias, trastornos neurodegenerativos, problemas hepáticos y renales, así como varios tipos de cáncer. El lobo marino de California (*Zalophus californianus*) representa una oportunidad única para estudiar la relación entre microbioma y cáncer en una especie silvestre. Esta especie tiene una predisposición alta a desarrollar, de forma espontánea, carcinoma urogenital (CUG), un tipo de cáncer altamente agresivo que afecta hasta al 25% de su población en California, EEUU. A la fecha no se han reportado casos de CUG en lobos marinos de las colonias ubicadas en aguas mexicanas, pero sí de una transformación pre-oncogénica. El objetivo de esta tesis fue caracterizar el microbioma cervical de hembras adultas de lobo marino de California, e identificar componentes del microbioma asociados a la transformación epitelial, y su relación con la presencia de dos virus oncogénicos, gama herpesvirus OtHV-1 y papilomavirus ZcPv-1. Se extrajo el ADN de muestras de epitelio cervical de hembras adultas que fueron capturadas en doce colonias reproductivas del Golfo de California, y se secuenció la región V3-V4 del gen 16S rRNA de cada muestra. Además se realizaron improntas para hacer el diagnóstico citológico de acuerdo al sistema de clasificación Bethesda para citologías vaginales. Se analizó la clasificación taxonómica de las secuencias y se calcularon las diversidades alfa y beta, los valores de abundancia diferencial de acuerdo a la procedencia geográfica y estado de salud epitelial, así como el modelado de redes de co-ocurrencia. Se observó que la diversidad alfa del microbioma genital de las hembras es menor en la región sur del Golfo de California, y que existen diferencias en el grado de inflamación del epitelio, así como en la presencia de ADN de OtHV-1. La diversidad beta varió entre regiones ecológicas. Las bacterias de las clases *Fusobacteriia* y *Clostridia* fueron más abundantes en el epitelio inflamado, en epitelios con diagnóstico citológico asociado a lesiones precancerosas, e infección por OtHV-1. Algunas de estas bacterias poseen mecanismos pro-oncogénicos, aunque su relación con el CUG es más compleja que la causalidad directa, ya que forman parte del microbioma núcleo, y son claves en la estructura de las redes de co-ocurrencia.

PALABRAS CLAVE

Carcinoma urogenital, lobo marino de California, microbioma genital, disbiosis, inflamación, OtHV-1, ZcPV-1, *Fusobacteriia*, *Clostridia*

ABSTRACT

The association between microbiota alterations, or dysbiosis, and chronic diseases such as asthma, obesity, inflammatory diseases, neurodegenerative disorders, liver and kidney problems, and various types of cancer is known for humans. California sea lion (*Zalophus californianus*) represents a unique opportunity to study the relationship between microbiome and cancer in a wild species. This species has a high predisposition to develop urogenital carcinoma (UGC) spontaneously. This is a highly aggressive type of cancer that affects up to 25% of its population in California, USA. To date, there are no reported cases of UGC in sea lions from colonies in Mexican waters, but pre-cancerous transformation has been reported. The objective of this thesis was to characterize the cervical microbiome of adult female California sea lions, and to identify components of the microbiome associated with epithelial transformation, as well as their relationship with the presence of the oncogenic viruses OtHV-1 and ZcPv-1. DNA was extracted from cervical mucosa samples that had been collected from adult females captured in twelve reproductive colonies within the Gulf of California. The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was sequenced and cervical smears were assessed using the Bethesda classification system to determine the status of the epithelium. The sequences obtained were processed to identify their taxonomic position, calculate alpha and beta diversities, differential abundance according to their geographic origin and epithelial health status, and build models of co-occurrence networks. Alpha diversity was lower in the cervical epithelium of females from the southern region of the Gulf of California, and differed according to the level of inflammation, as well as presence/absence of OtHV-1 DNA. Beta diversity differed between ecological regions. Bacteria belonging to *Fusobacteriia* and *Clostridia* classes were more abundant in samples with epithelial inflammation, cytological diagnoses associated with pre-cancerous lesions, and OtHV-1 infection. Some of these bacteria have pro-oncogenic mechanisms, but their relationship with UGC is likely more complex than direct causality, since they are part of the core microbiome, and are key players in the structure of co-occurrence networks.

KEYWORDS

Urogenital carcinoma, California sea lion, genital microbiome, dysbiosis, inflammation, OtHV-1, ZcPV-1, *Fusobacteriia*, *Clostridia*.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos aquellos que me ayudaron en la elaboración de este trabajo, quienes participaron de manera directa o indirecta para llevar a buen puerto para la conclusión de esta tesis

- A la Universidad Autónoma de Querétaro por los conocimientos que me permitieron dar un paso más en mi vida académica.
- A CONACYT, quien me otorgó una beca (No. 925927) para continuar con mis estudios de posgrado.
- A Karina, mi directora de tesis, quien me guió durante todo el proceso de elaboración de la tesis, me dio su confianza para integrarme a su equipo de trabajo, me ayudó a dar un paso más en mi vida académica, y me enseñó lo genial que es el trabajo científico.
- A mi familia y mi compañera de vida, Lau, quienes me apoyaron en todo momento para continuar con mi formación.
- A Cecilia, Nami, Carlos, Aranzazu, Valeria, Anaí, y demás miembros del laboratorio, quienes me ayudaron con sus valiosos consejos, y a Luis, Nacho, Marina y demás involucrados en la obtención de las muestras con las que trabajé.
- A los vigilantes de la Cooperativa Pescadores Nacionales de Abulón, por su ayuda y compañía durante la salida de campo al archipiélago de San Benito, que aunque no fue parte de este proyecto, sí que fue parte de la experiencia de hacer ciencia.
- A Fausto, Roberto, Etsel y Rolando, quienes ayudaron a darle forma a esta tesis, con sus sugerencias como sinodales, y sus enseñanzas como profesores de la maestría

DEDICATORIA

A la Cuca, mi hermana, que estaba en este mundo cuando inicié este camino, pero el cáncer se la llevó. Eso me inspiró aún más para arrebatarle un pedacito al cáncer a través de esta tesis.

“Cancer affects all of us, whether you're a daughter, mother, sister, friend, coworker, doctor, patient.”

Jennifer Aniston

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y ÉTICA PROFESIONAL

Declaro que el trabajo que se presenta en esta tesis fue realizado por mí, a excepción de aquellas secciones que formaron parte de colaboraciones, mismas que se indican explícitamente en el texto.

Confirmando que las ideas originales aquí presentadas son de mi autoría y que a lo largo de la tesis le he dado crédito al trabajo de otros mediante el uso adecuado de las referencias.

Esta copia se ha sometido a la Universidad Autónoma de Querétaro bajo el entendido de que constituye material con derechos de autor y que no puede citarse ningún pasaje de esta tesis sin darle el crédito adecuado.

Las muestras utilizadas en este proyecto fueron colectadas de manera ética y legal bajo el permiso de colecta SGPA/DGVS/09004/15 con fecha de 18 de agosto de 2015

ÍNDICE

Introducción	Error! Bookmark not defined.
Antecedentes	15
La microbiota y el microbioma.....	15
Establecimiento del microbioma	18
Disbiosis y cáncer.....	20
Microbioma cervicovaginal.....	22
Microbioma núcleo.....	27
El cáncer	29
Neoplasias: Clasificación y nomenclatura	33
Clasificación de lesiones epiteliales cervicales	34
Cáncer en vida silvestre.....	36
El carcinoma urogenital del lobo marino de California	38
Justificación	46
Hipótesis	47
Objetivos	48
General	48
Específicos.....	48
Materiales y métodos	49
Especie de estudio.....	49
Colecta de muestras	50
Citologías.....	51
Extracción y secuenciación de ADN	52
Análisis bioinformáticos y estadísticos	55
Resultados y discusión	58
Objetivo 1. Comparar el microbioma genital cervical de las hembras adultas de lobo marino de California con el microbioma de otros mamíferos carnívoros	58
Microbioma núcleo.....	60
Objetivo 2. Dilucidar si existen patrones diferenciales en las comunidades del microbioma cervical del lobo marino de California en las distintas regiones ecológicas del Golfo de California.....	65

Objetivo 3. Determinar las diferencias en abundancia y ensamblaje del microbioma cervical de lobos marinos de California con epitelio sano y con transformación pre-oncogénica.....	72
Microbioma en estados de inflamación epitelial	85
Objetivo 4. Investigar la asociación del microbioma cervical con la infección por virus de potencial oncogénico.....	101
Objetivo 5. Identificar relaciones de co-ocurrencia entre los miembros de la comunidad bacteriana en hembras sanas, con transformación pre-oncogénica, e infectadas con virus oncogénicos	109
Conclusiones.....	131
Bibliografía.....	133

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Algunos ejemplos de oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de ADN.....	30
Cuadro 2	Datos de los individuos de <i>Z. californianus</i> incluidos en el estudio.....	54
Cuadro 3	ASVs pertenecientes al microbioma núcleo de 50% de prevalencia y 0.1% de abundancia, y especies con las que tienen mayor similitud, de acuerdo a la herramienta en línea BLAST.....	63
Cuadro 4	ASVs más abundantes en las distintas regiones ecológicas....	69
Cuadro 5	ASVs más abundantes en dos regiones ecológicas.....	70
Cuadro 6	ASVs menos abundantes en las distintas regiones ecológicas.	71
Cuadro 7	Abundancia diferencial entre muestras negativas a displasia celular y con ASC.....	75
Cuadro 8	ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras negativas a displasia celular y con ASC.....	77
Cuadro 9	Abundancia diferencial entre muestras negativas a displasia celular y con LSIL.....	78
Cuadro 10	ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras sin displasia celular y muestras con LSIL.....	80
Cuadro 11	Abundancia diferencial entre muestras sin displasia celular y con ASCUS.....	82
Cuadro 12	Abundancia diferencial entre muestras sin displasia celular y con LSIL E.....	83
Cuadro 13	Abundancia diferencial entre muestras sin inflamación y con inflamación moderada.....	94
Cuadro 14	Abundancia diferencial entre muestras sin inflamación y con inflamación alta.....	97
Cuadro 15	ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras sin inflamación y con inflamación moderada.....	100
Cuadro 16	ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras sin inflamación y con inflamación alta.....	100
Cuadro 17	Resultados del PERMANOVA según diagnóstico de virus potencialmente oncogénicos.....	103
Cuadro 18	Abundancia diferencial entre muestras con diagnóstico positivo y negativo a OthV-1.....	104

Cuadro 19	ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras con diagnóstico negativo y positivo a OtHV-1.....	105
Cuadro 20	Abundancia diferencial entre muestras con diagnóstico positivo y negativo a ZcPV-1.....	108
Cuadro 21	ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras con diagnóstico negativo y positivo a ZcPV-1.....	108
Cuadro 22	22 ASVs identificados como especies clave.....	111
Cuadro 23	ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de <i>Zalophus californianus</i> con diagnóstico citológico de ASC.....	114
Cuadro 24	ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de <i>Zalophus californianus</i> con diagnóstico citológico de LSIL.....	115
Cuadro 25	ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de <i>Zalophus californianus</i> con diagnóstico citológico negativo a displasia epitelial.....	116
Cuadro 26	ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de <i>Zalophus californianus</i> con inflamación epitelial moderada.....	117
Cuadro 27	ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de <i>Zalophus californianus</i> con inflamación epitelial alta.....	120
Cuadro 28	ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de <i>Zalophus californianus</i> con diagnóstico de OtHV-1 negativo.....	122
Cuadro 29	ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de <i>Zalophus californianus</i> con diagnóstico de OtHV-1 positivo.....	124
Cuadro 30	ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de <i>Zalophus californianus</i> con diagnóstico de ZcPV-1 negativo.....	126
Cuadro 31	ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de <i>Zalophus californianus</i> con diagnóstico de ZcPV-1 positivo.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Modelo propuesto de la transformación oncogénica del epitelio genital del lobo marino de California	45
Fig. 2	Mapa con las 12 colonias en donde se tomaron muestras durante el verano de 2016.....	51
Fig. 3	Curvas de rarefacción para las muestras incluidas en el estudio....	58
Fig. 4	Gráfica de abundancias relativas de los hisopados del cérvix de hembras de <i>Zalophus californianus</i> , agrupadas por clase.....	59
Fig. 5	Gráfica que muestra los ASVs que tienen un mínimo de 50% de prevalencia en las muestras y al menos una muestra con una abundancia mínima de 0.01%, y su variación según se modifiquen los niveles de abundancia y prevalencia.....	61
Fig. 6	Microbioma núcleo, con abundancia de 0.1% y prevalencia de 50%.....	62
Fig. 7	Espectros de entropía de Rényi agrupados por región ecológica, de acuerdo a la regionalización propuesta por Szteren y Auriolles-Gamboa (2011).....	65
Fig. 8	Análisis de PCoA de las muestras de epitelio genital de hembras adultas de <i>Zalophus californianus</i> , agrupadas por región ecológica.....	66
Fig. 9	Abundancia diferencial en muestras de epitelio genital de hembras adultas de <i>Zalophus californianus</i> , agrupadas por región ecológica.....	67
Fig. 10	Espectros de entropía de Rényi agrupados por diagnóstico citológico, de acuerdo con el sistema de clasificación Bethesda para citologías vaginales.....	72
Fig. 11	Análisis de PCoA agrupado por diagnóstico citológico.....	73
Fig. 12	Abundancia diferencial por diagnóstico citológico, de acuerdo al sistema Bethesda para diagnóstico citológico.....	74
Fig. 13	Abundancia diferencial por diagnóstico citológico, comparando entre muestras negativas a lesión intraepitelial y con ASCUS o LSIL E.....	81
Fig. 14	Espectros de entropía de Rényi agrupados por grado de inflamación.....	85
Fig. 15	Análisis de PCoA de las muestras de epitelio genital de hembras adultas de <i>Zalophus californianus</i> , agrupadas por grado de inflamación.....	86
Fig. 16	Abundancia diferencial por grado de inflamación epitelial.....	88
Fig. 17	Espectros de entropía de Rényi agrupados por diagnóstico de OthV-1.....	101
Fig. 18	Espectros de entropía de Rényi agrupados por diagnóstico de ZcPV-1.....	101
Fig. 19	Análisis de PCoA de las muestras de epitelio genital de hembras adultas de <i>Zalophus californianus</i> , agrupadas por diagnóstico de OthV-1.....	102

Fig. 20	Análisis de PCoA de las muestras de epitelio genital de hembras adultas de <i>Zalophus californianus</i> , agrupadas por diagnóstico de ZcPV-1.....	102
Fig. 21	Abundancia diferencial en muestras de epitelio genital de hembras adultas de <i>Zalophus californianus</i> , agrupadas por diagnóstico de OtHV-1; positivo vs. negativo.....	103
Fig. 22	Abundancia diferencial en muestras de epitelio genital de hembras adultas de <i>Zalophus californianus</i> , agrupadas por diagnóstico de ZcPV-1; positivo vs. negativo.....	107
Fig. 23	Red de co-ocurrencia bacteriana.....	110
Fig. 24	Red de co-ocurrencia bacteriana, con los nodos (ASV's) coloreados según el módulo al que pertenecen.....	112
Fig. 25	Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico citológico de ASC.....	114
Fig. 26	Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico citológico de LSIL.....	115
Fig. 27	Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico citológico negativo a displasia epitelial.....	116
Fig. 28	Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con inflamación epitelial moderada.....	117
Fig. 29	Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con inflamación epitelial alta.....	119
Fig. 30	Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico de OtHV-1 negativo.....	121
Fig. 31	Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico de OtHV-1 positivo.....	123
Fig. 32	Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico de ZcPV-1 negativo.....	126
Fig. 33	Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico de ZcPV-1 positivo.....	128

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud importante para la medicina humana y animal. Típicamente, los casos de cáncer en animales de vida silvestre son escasos; sin embargo, hay reportes de cáncer en algunas especies, entre ellas el demonio de Tasmania, (*Sarcophilus harrisi*), el peramélido rayado occidental, (*Perameles bougainville*), la ballena beluga, (*Delphinapterus leucas*), y el lobo marino de California (*Zalophus californianus*) (McAloose y Newton, 2009). De estos reportes, el del lobo marino de California cobra particular relevancia en términos de su patogenia y epidemiología, que es semejante al carcinoma cérvico uterino del humano, y a su alta prevalencia, que llega casi al 25% de los animales varados en las costas de California (Browning et al., 2015)

En los años 80 se reportó por primera vez la presencia de tumores de células transicionales en diversos órganos de lobos marinos adultos varados a los que se les practicó la necropsia. Posteriormente se determinó su naturaleza urogenital, con metástasis agresiva a distintos sitios (Gulland et al., 1996). Se han identificado diversos factores asociados a este proceso de transformación, entre ellos la consanguinidad (Acevedo-Whitehouse et al., 2003), la presencia del locus Zaca-DRB.A del MHC de clase II (Bowen et al., 2005), aumento de la expresión de la proteína p53, disminución en la expresión de receptores de estrógenos (Colegrove et al., 2009a), contaminantes ambientales (Ylitalo et al., 2005), infección por gammaherpesvirus (Buckes et al., 2006) y la presencia de *Streptococcus* β -hemolíticos (Johnson et al., 2006). A la fecha, el carcinoma urogenital solamente se ha encontrado en lobos marinos residentes en aguas estadounidenses, aunque en aguas mexicanas se ha encontrado transformación precancerosa (Barragán-Vargas et al., 2016), lo que ha generado interés por entender cuáles otros factores pueden incrementar el riesgo de una malignización del epitelio.

El presente trabajo busca caracterizar el microbioma cervical del lobo marino de California e investigar su relación con la transformación epitelial genital precancerosa. Para ello se colectaron muestras de 46 hembras adultas en 12 de las

13 colonias reproductivas del Golfo de California. Se extrajo el ADN de las muestras y se amplificó un fragmento de la región 16S rRNA (Valenzuela-González et al., 2015), para posteriormente ensamblar y filtrar las secuencias brutas con ayuda de software bioinformático, y compararlas con una base de datos de rARN bacteriano (Quast et al., 2013). Se identificaron las variantes de secuencias amplificadas (ASVs, por sus siglas en inglés) y se calcularon diversidades y abundancias bacterianas (Callahan et al., 2016; Lahti y Shetty, 2018; McMurdie y Holmes, 2013) para determinar la diversidad filogenética del epitelio cervical de las hembras con respecto al estado de su epitelio, así como a la presencia de infecciones por virus potencialmente oncogénicos.

ANTECEDENTES

La microbiota y el microbioma

Las bacterias son de gran importancia en el ambiente terrestre; basta recordar que en el pasado las cianobacterias fueron capaces de modificar la composición de la atmósfera (Gibbons y Gilbert, 2015). Estos microorganismos son ubicuos, llamándosele microbiota a los microorganismos presentes en un nicho ecológico particular (Sebastián y Sánchez, 2018). En animales, incluido el humano, algunos de estos nichos ecológicos se encuentran en los epitelios de la piel, ojos, intestinos, pulmones y en las mucosas genitales (Michel et al., 2017). En contraste, el término microbioma se usa para denotar el conjunto de los genes de los microorganismos que ocupan un nicho ecológico dado (Michel et al., 2017; Sebastián y Sánchez, 2018). El papel de la microbiota y su interacción con el hospedero es de gran importancia, dada la gran cantidad de bacterias que pueden habitar en un organismo. Por ejemplo, se calcula que las bacterias presentes en el ser humano tienen una relación de 1:1 a 1:1.3 con respecto a las células humanas, llegándose incluso a considerar a la microbiota como un órgano más del cuerpo humano (Alarcón et al., 2016; Sebastián y Sánchez, 2018).

Las relaciones simbióticas entre los microorganismo y sus hospederos dependen del contexto, de tal manera que un microorganismo en particular puede ser un comensal, mutualista o parásito para el hospedero según diversos factores genéticos, nutricionales y la presencia de otros microorganismos (Belkaid y Hand, 2014; Belkaid y Harrison, 2017). Una parte importante del contexto microbiota-hospedero está dado por el sistema inmune, con el cual la microbiota interactúa, promoviendo y valorando diversos aspectos, en una especie de “ajuste funcional” (Belkaid y Harrison, 2017). Dicho ajuste sucede a nivel local, aunque puede tener efectos sistémicos, como ocurre con la microbiota entérica. Por ejemplo, en ratones se observó que el tamaño de las reservas de células mieloides en la médula ósea se correlaciona con una mayor complejidad de la microbiota intestinal (Balmer et al., 2014; Belkaid y Harrison, 2017).

Varios efectores participan en mantener la homeostasis entre la microbiota y el hospedero y evitar la colonización por otros microorganismos. Algunas células epiteliales especializadas producen moco, que forma una barrera física entre el epitelio y la microbiota; lo que se ha visto tanto en intestino como en pulmones (Belkaid y Harrison, 2017; Mathieu et al., 2018). También la producción de inmunoglobulina Ig-A y diversos péptidos antimicrobianos ayudan a mantener la homeostasis (Belkaid y Harrison, 2017; Mathieu et al., 2018). Las bacterias que puedan llegar a traspasar estas barreras primarias, son fagocitadas por macrófagos tisulares o células dendríticas en la lámina propia; presentan los antígenos bacterianos a células Treg y Th17; y estas sintetizan, entre otras citocinas, IL-22, que promueve la producción de péptidos antimicrobianos, la producción de moco y regeneración epitelial (Belkaid y Hand, 2014). Todos estos mecanismos limitan la exposición a moléculas inmunogénicas y antígenos de bacterias comensales, así como la activación de señales proinflamatorias (Belkaid y Hand, 2014).

La Ig-A juega un papel fundamental en el mantenimiento de las comunidades bacterianas en sus respectivos nichos. Con ayuda de las células dendríticas, los linfocitos B en las placas de Peyer del intestino producen Ig-A que se une a antígenos de los comensales (Belkaid y Harrison, 2017). La Ig-A es llevada por transcitosis a la luz gastrointestinal, donde evita la adhesión bacteriana al epitelio y la translocación a través de él (Belkaid y Harrison, 2017). También limita la movilidad de bacterias patógenas al unirse a las flagelinas, e intercepta bacterias intracelulares y toxinas bacterianas; estas funciones las realiza sin activar el sistema del complemento, disminuyendo así las reacciones inflamatorias (Alarcón et al., 2016; Belkaid y Harrison, 2017).

Además de las respuestas humorales, una población de células Th1 y Th17 se encuentra en el epitelio intestinal y en la piel, y estas células son capaces de responder a estímulos provenientes de la microbiota (Belkaid y Harrison, 2017). Como se mencionó antes, dichas células producen citocinas que promueven la producción de péptidos antimicrobianos y el reforzamiento de uniones celulares;

también pueden fomentar la producción de Ig-A (Belkaid y Harrison, 2017).

La microbiota provee además una barrera que impide la llegada o la proliferación de organismos potencialmente patógenos. Así, los microorganismos residentes ocupan los nichos disponibles y consumen los recursos existentes (Guarner y Malagelada, 2003; Guarner, 2007; Belkaid y Hand, 2014). Los efectos en la disponibilidad de nutrientes pueden afectar también la expresión de genes de virulencia de patógenos como *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Clostridium difficile*, *Salmonella entérica* y *S. typhimurium* (Belkaid y Hand, 2014). Algunas bacterias directamente producen péptidos antimicrobianos que influyen en la estabilidad de la microbiota, como *E. coli* en el intestino, que sintetiza bacteriocinas que inhiben el crecimiento de la variante enterohemorrágica; o *Staphylococcus epidermitis*, que genera proteasas que limitan la formación de biofilms de *S. aureus* en la piel (Guarner y Malagelada, 2003; Belkaid y Hand, 2014)

Diversos metabolitos bacterianos son capaces de saltar las barreras anatómicas y fisiológicas, dispersándose a nivel sistémico e influyendo en procesos como la hematopoyesis (Belkaid y Harrison, 2017). Los ácidos grasos de cadena corta producidos por bacterias intestinales promueven la activación de precursores de células dendríticas; mientras que los ligandos de receptores NOD1 estimulan a las células madre mesenquimales a producir factores de crecimiento hematopoyético, como IL-6 y 7, factor de células madre, Flt3L y ThPO (Belkaid y Harrison, 2017; Iwamura et al., 2017). Los precursores de las células dendríticas activadas por ácidos grasos pueden movilizarse a lugares tan distantes como los pulmones, y limitar la activación de células Th2 (Belkaid y Harrison, 2017). En la piel, la colonización por *S. epidermitis* favorece la llegada de células T CD8+ y promueve vías de señalización antimicrobianas en los queratinocitos (Belkaid y Harrison, 2017). Por otro lado, otras bacterias comensales pueden modular la producción de IL-1 α , que controla la capacidad de los linfocitos T de producir otras citocinas proinflamatorias como IFN- γ e IL-17A (Belkaid y Hand, 2014; Belkaid y Harrison, 2017).

Es también relevante el papel de la microbiota gastrointestinal en el metabolismo. En el colon humano los microorganismos metabolizan polisacáridos vegetales no digeribles (fibras), algunas proteínas, secreciones enzimáticas, moco y células descamadas (Guarner, 2011; Alarcón et al., 2016). La fermentación de polisacáridos vegetales produce ácidos grasos de cadena corta que, además de los efectos en la homeostasis inmune mencionados con anterioridad, también representan una fuente extra de energía absorbible por el epitelio intestinal (Guarner, 2011; Alarcón et al., 2016). Las bacterias intestinales producen algunas vitaminas del complejo B y la vitamina K, y sintetizan aminoácidos a partir del amoníaco y la urea (Guarner, 2011). También favorecen el metabolismo de ácidos biliares, modificando la absorción de lípidos y homeostasis del colesterol (Alarcón et al., 2016). El 90% de la serotonina del cuerpo humano es producida por la microbiota intestinal, y la producción de GABA, factor neurotrófico derivado del cerebro y otras sustancias involucradas en la plasticidad cerebral y el aprendizaje emocional también están mediados por vías de señalización en las que se involucra la microbiota intestinal (Schnorr et al., 2016).

Establecimiento del microbioma

Hasta hace poco se pensaba que la colonización bacteriana iniciaba tras el nacimiento, sin embargo, estudios recientes han mostrado que dicha colonización puede empezar antes (Alarcón et al., 2016). Se sabe que la placenta, antes considerada estéril, alberga un microbioma característico, similar al de la cavidad oral (Aagaard et al., 2014). En el líquido amniótico y el meconio del recién nacido también se ha podido encontrar evidencia de colonización bacteriana (Alarcón et al., 2016; DiGiulio et al., 2008; Romano-Keeler y Weitkamp, 2015).

El calostro y la leche materna contienen, además de elementos nutritivos, Ig-A, microorganismos y sus metabolitos, células inmunes y algunas citocinas (Belkaid y Hand, 2014). La capacidad del neonato para aceptar la microbiota transmitida por la madre a través de la lactancia está dada, por una parte por las

propias Ig-A maternas que restringen la activación inmune, y por la inmadurez del sistema inmune neonatal (Belkaid y Hand, 2014). El sistema inmune del neonato se caracteriza por una producción disminuida de citocinas proinflamatorias y un desarrollo de linfocitos T y B sesgado en favor de respuestas regulatorias, lo cual tiene el efecto secundario de incrementar la susceptibilidad a infecciones en el recién nacido, pero asegura el establecimiento de la microbiota sin que se activen respuestas inflamatorias (Belkaid y Hand, 2014).

La composición de la microbiota neonatal del humano es similar entre la piel y las cavidades nasal y oral, pero difiere entre estos sitios y el meconio (Chu et al., 2017). Además, influye sobre la composición de la microbiota el que el parto haya sido natural o por cesárea. En el primer caso la microbiota de la piel y cavidades nasal y oral es dominado por bacterias asociadas al epitelio vaginal materno, mientras que en el segundo caso se encuentran más bacterias asociadas a la piel y al ambiente (Schnorr et al., 2016; Chu et al., 2017). Hacia las seis semanas de edad este panorama cambia, encontrándose entonces diferencias según el sitio de procedencia, y ya no entre el modo de nacimiento (Chu et al., 2017).

Durante los primeros meses de vida diversos factores van modelando la composición de la microbiota. Los microorganismos presentes en la leche materna ayudan a configurar la microbiota intestinal, especialmente en los primeros meses de vida, cuando este es el único alimento que ingiere la cría; e incluso influyen en el desarrollo pulmonar (Tamburini et al., 2016; Robertson et al., 2019). En esta etapa, existe una dominancia de organismos involucrados en el metabolismo de los oligosacáridos de la leche materna, con presencia de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Tamburini et al., 2016; Robertson et al., 2019). Una vez que se inicia la alimentación sólida, se produce un incremento en la diversidad microbiana, integrándose microorganismos capaces de degradar carbohidratos complejos, mucinas, y producir ácidos grasos de cadena corta (Robertson et al., 2019). A los 2-3 años de edad la microbiota se considera “madura”

en el humano (Alarcón et al., 2016).

Durante este periodo la exposición a enteropatógenos a través de alimentos y agua contaminados y pobres condiciones de higiene puede provocar alteraciones en la microbiota residente (Robertson et al., 2019). El uso de antibióticos también puede producir disturbios, al reducir la abundancia de bacterias como *Lactobacillus* y diversas clostridiales, con lo que disminuye la actividad de linfocitos Th17 y la producción de IL-22 (Tamburini et al., 2016). Esto puede favorecer la aparición de trastornos como asma, alergias alimentarias, enfermedades inflamatorias intestinales e, incluso, diabetes tipo 2 (Tamburini et al., 2016).

Disbiosis y cáncer

En el ser humano se han realizado numerosas investigaciones sobre la relación entre alteraciones en el microbioma (condición conocida como disbiosis) y el desarrollo de algunas enfermedades. La enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome de intestino irritable, asma, obesidad, enfermedades hepáticas y renales, trastornos neurodegenerativos y artritis reumatoide son todas condiciones que se han relacionado con estados de disbiosis (Pacheco-Pérez et al., 2019; Sebastián y Sánchez, 2018).

Desde hace tiempo se sabe que el desarrollo del cáncer tiene un componente genético, además de diversos factores ambientales, como la exposición a sustancias carcinógenas o la radiación UV (Bhatt et al., 2017; Garrett, 2015). El desarrollo de nuevas técnicas de análisis de comunidades bacterianas, no dependientes de cultivos, han permitido explorar de manera más exacta el papel de estas comunidades en el desarrollo del cáncer (Rajagopala et al., 2017)

Actualmente once agentes biológicos están clasificados como carcinogénicos para el ser humano por la Agencia Internacional para el Estudio del

Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés): Los virus de Eptein-Barr, Hepatitis B y C, herpesvirus del Sarcoma de Kaposi, HIV-1, virus del papiloma humano, virus linfotrópico humano de células T tipo 1, los parásitos *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Schistosoma haematobium* y la bacteria *Helicobacter pylori*, que promueve el desarrollo de cáncer de estómago (Bhatt *et al.*, 2017; Bouvard *et al.*, 2009). Sin embargo, la relación entre microbioma y cáncer, dada la gran cantidad de especies presentes, va más allá de una causalidad directa entre la bacteria y la enfermedad (Michel *et al.*, 2017)

Se han identificado varios mecanismos por los cuales un estado de disbiosis puede promover el desarrollo del cáncer. Existen bacterias que producen sustancias que producen daño directo al ADN, o bien daño indirecto al alterar funciones inmunes (Garrett, 2015; Rajagopala, *et al.*, 2017). Otras activan vías de señalización de proliferación celular, o son capaces de alterar el metabolismo del hospedero o el de otras bacterias (Garrett, 2015).

Helicobacter pylori, además de inducir inflamación crónica, produce la citotoxina, CagA, que interactúa con la β -catenina, una proteína involucrada en una vía de señalización, Wnt- β -catenina, que regula el crecimiento y la proliferación celular (Garrett, 2015). La bacteria *H. pylori* altera esta vía, llevando al desarrollo de cáncer (Garrett, 2015, Ochoa-Hernández *et al.*, 2012). *Fusobacterium nucleatum*, si bien aún no está reconocida por la IARC como carcinogénica, tiene mecanismos que están siendo estudiados por su contribución en el desarrollo del cáncer de colon en humanos (Garret, 2015). A través de su proteína de adhesión FadA, modula la E-cadherina y β -catenina en el colon, incrementando la expresión de diversos factores de transcripción, oncogenes y genes relacionados con la respuesta inflamatoria; con esto estimula la proliferación celular y crea un microambiente proinflamatorio en el colon (Garret, 2015; Rubinstein *et al.*, 2013). También promueve la infiltración de macrófagos asociados a tumores (TAM) que producen factores de crecimiento epitelial y factores pro-angiogénicos e inhiben la citotoxicidad de las células NK (Hashemi Goradel *et al.*, 2018).

Escherichia coli produce la colibactina, una toxina que directamente produce daño al DNA, al igual que la toxina distensora citoletal (CDT), que es metabolizada por muchas proteobacterias ϵ y γ (Garret, 2015; Rajagopala, et al., 2017). La toxina de *Bacteroides fragilis* (Bft), en contraste, no produce daño directo al ADN, pero desencadena la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que a la larga pueden alterar los mecanismos de reparación (Garret, 2017). Otros metabolitos bacterianos, como el lipopolisacárido de la pared celular de bacterias Gram negativas puede inducir inflamación hepática crónica, promoviendo el desarrollo de carcinoma hepatocelular; además en este caso se trata de un efecto a distancia, proveniente de bacterias gastrointestinales, y cuyos metabolitos viajan por vía sanguínea a sitios lejanos (Rajagopala, et al., 2017).

Microbioma cervicovaginal

El cérvix, la porción fibromuscular inferior del útero, posee dos zonas bien diferenciadas: un endocérvix, que termina en el orificio interno hacia la cavidad uterina; y el exocérvix, que finaliza en el orificio interno que desemboca en la vagina (Sellors y Sankaranarayanan, 2003). El endocérvix está cubierto de epitelio cilíndrico, formado por una única capa de células; esta capa se pliega formando las criptas endocervicales (Sellors y Sankaranarayanan, 2003). El exocérvix, al igual que la vagina, está formado por epitelio escamoso estratificado; se distinguen los estratos basal, parabasal, intermedio y superficial (Sellors y Sankaranarayanan, 2003). Existe una zona de convergencia de ambos epitelios, denominada unión escamoso-cilíndrica, donde se puede apreciar un “escalón” dado por la diferencia de altura entre los epitelios (Sellors y Sankaranarayanan, 2003).

Incluso regiones genitales más internas contienen bacterias comensales: Hasta hace poco, se creía que el útero y las trompas de Falopio eran ambientes estériles, pero recientes investigaciones han mostrado que en estos sitios también hay comunidades bacterianas variadas (Chen et al., 2017). Sin embargo, el tracto

reproductivo superior tiene mayor diversidad de bacterias, mientras que, en general, el tracto reproductivo inferior posee una marcada dominancia del género *Lactobacillus* (Chen et al., 2017). A su paso por el canal de parto, la vagina es colonizada por dicho género; sin embargo, hasta antes de la pubertad la mucosa es delgada y escasa en nutrientes, lo que no favorece su proliferación (Álvarez-Calatayud et al., 2015; Alarcón et al., 2016). La microbiota prepuberal es resultado de la contaminación desde la piel e intestino, con dominancia de las familias *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcaceae* (Alarcón et al., 2016; Álvarez-Calatayud et al., 2015; Torcia, 2019). En la pubertad el epitelio se hace más grueso y empieza a secretar exudados (fluido cervicovaginal), ricos en nutrientes y mucinas, péptidos antimicrobianos como B-defensina, lipocalina, elafina, SLPI (Inhibidor de proteasas secretado por leucocitos), e inmunoglobulinas Ig-A e Ig-G (Álvarez-Calatayud et al., 2015; Torcia, 2019). Además, el aumento en la producción de estrógenos favorece la acumulación de glucógeno, que es degradado a maltosa, maltotriosa y α -dextrinas por la α -amilasa presente en el epitelio vaginal (Torcia, 2019; Witkin y Linhares, 2017). Estos carbohidratos son aprovechados por los *Lactobacillus*, permitiéndoles convertirse en las especies dominantes durante la madurez sexual del hospedero (Witkin y Linhares, 2017).

Son cuatro las especies de *Lactobacillus* que suelen encontrarse en mayor abundancia en el epitelio vaginal: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*. (Martín et al., 2008; Lewis et al., 2017; Laniewski et al., 2018) En algunas mujeres se ha encontrado predominancia de anaerobios obligados, como *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella* y *Sneathia* (Lewis et al., 2017; Laniewski et al., 2018). Las comunidades bacterianas vaginales del humano se pueden dividir en distintos grupos, según las bacterias predominantes; la clasificación más usada distingue entre cinco tipos de condición comunitaria (CST) (Lewis et al., 2017). Los CST I, II, III y V están dominados respectivamente por *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* (Lewis et al., 2017). El CST IV es más heterogéneo con mayor proporción de anaerobios obligados, y se divide en dos subtipos, CST IV-A y CST IV-B, teniendo la segunda menor proporción de *Lactobacillus* y mayor cantidad de anaerobios obligados que

la primera (Lewis et al., 2017). Estas comunidades son dinámicas y pueden cambiar de unas a otras, aunque CST I suele ser muy estable, CST II, III y V menos estables y el CST IV puede tener cambios rápidos a otras condiciones; finalmente, varias de las especies halladas en el CST V-B se han asociado a vaginosis bacteriana (Lewis et al., 2017; Laniewski et al., 2018).

Lactobacillus forma biopelículas que evitan la colonización de otras bacterias, al adherirse de manera específica a las células epiteliales, ayudados por el fluido cervicovaginal (Martín et al., 2008; Aldunate et al., 2015). También producen diversas sustancias con potencial antimicrobiano, como especies reactivas de oxígeno (ROS), bacteriocinas, agentes tensoactivos y ácido láctico (Álvarez-Calatayud et al., 2015; Martín et al., 2008). *L. crispatus* y *L. jensenii* pueden disminuir la secreción de IL-6, IL-8 y TNF α , generando un ambiente adverso para el desarrollo de patógenos potenciales, pero sin desencadenar inflamación (Aldunate et al., 2015; Witkin y Linhares, 2017)

En el microambiente vaginal existe un flujo de sangre limitado, lo que resulta en anaerobiosis, bajo la cual las células epiteliales producen ácido láctico por el metabolismo anaerobio de la glucosa, aunque son los *Lactobacillus* los que aportan la mayor parte (Witkin y Linhares, 2017). Gracias a este compuesto, el pH vaginal se mantiene por debajo de 4, lo que por sí solo inhibe el crecimiento de muchas bacterias, aunque no es el único efecto (Martín et al., 2008; Álvarez-Calatayud et al., 2015; Kwasniewski et al., 2018). Existen dos isómeros del ácido láctico, D- y L- y las células humanas en su mayoría solo producen el L-ácido láctico, mientras que los lactobacilos, a excepción de *L. inners*, pueden producir ambos (Witkin y Linhares, 2017). El isómero L- disminuye la producción de una metaloproteasa de matriz extracelular (MMP-8) que puede degradar el tapón mucoso cervical, y con ello permitir la entrada de bacterias al tracto genital superior (Witkin y Linhares, 2017).

El D-ácido láctico es un inhibidor de la histona-deacetilasa y activador de

enzimas de reparación de ADN, por lo que ayudaría al epitelio vaginal a recuperarse del daño por químicos externos y compuestos presentes en el semen (Witkin y Linhares, 2017). La inhibición de histona-deacetilasa también puede activar la transcripción de genes de la respuesta inmune innata, como la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos, que a su vez inhibe los sideróforos bacterianos, disminuyendo el aprovechamiento de hierro y por ende su crecimiento; también promueve la activación de linfocitos Th17, la maduración de células dendríticas y la producción de interferón (Witkin y Linhares, 2017; Kwasniewski et al., 2018). Otra acción del ácido láctico es la promoción de la autofagia, gracias la cual las células pueden secuestrar organelos o proteínas defectuosas, bacterias intracelulares, virus y protozoarios dentro de autofagosomas, para su posterior degradación (Witkin y Linhares, 2017).

Como ya se mencionó antes, el CST IV-B tiene en su composición una alta abundancia de bacterias asociadas con vaginosis bacteriana y los *Lactobacillus* dejan de ser los organismos predominantes; no obstante, un alto porcentaje de mujeres están clínicamente sanas a pesar de tener microbiotas tradicionalmente asociadas a estados de disbiosis (Lewis et al., 2017). Aun así, la pérdida de dominancia de *Lactobacillus* puede llevar a cambios en la homeostasis epitelial, con producción de citocinas proinflamatorias, reclutamiento de células inmunes y reducción en la viscosidad del fluido cervicovaginal debido a la producción de enzimas degradadoras de mucina (Lewis et al., 2017; Torcia et al., 2019). Bacterias como *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Megasphaera*, y *Sneathia* entre otras, producen ácidos orgánicos de cadena corta distintos al ácido láctico, como acetato, butirato, propionato y succinato (Aldunate et al., 2015). El acetato y el butirato inducen la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los linfocitos mononucleares en sangre periférica; mientras que el succinato y el acetato inhiben la migración de neutrófilos y monocitos, por lo que favorecen el crecimiento indiscriminado de las bacterias causantes de vaginosis bacteriana (Aldunate et al., 2015).

La vaginosis bacteriana se asocia con inflamación genital crónica y una mayor persistencia de infecciones por virus del papiloma humano (VPH), el cual es un conocido agente con potencial carcinogénico (Lewis *et al.*, 2017; Kwasniewski *et al.*, 2018; Laniewski *et al.*, 2018). Además, patógenos como *Chlamydia trachomatis* han sido asociados con el desarrollo de neoplasias cervicales (Audirac-Chalifour *et al.*, 2016). *Chlamydia trachomatis* tiende a activar la respuesta inmune por linfocitos Th2, produciendo inflamación crónica, además de dificultar el aclarado del VPH, que se lleva a cabo por mecanismos mediados por linfocitos Th1; promueve la liberación de citocinas proinflamatorias, radicales libres y óxido nítrico, lo que puede provocar daño en el ADN y en las proteínas reparadoras (Hernanz-Lozón, 2017; Pinzón-Fernández, 2019). Además, *C. trachomatis* expresa en su membrana una proteína de choque térmico conocida como cHSP60, que es capaz de generar inmunidad cruzada con la HSP60 humana, generando autoinmunidad contra las células epiteliales, y generando con ello más inflamación crónica (Jutinico-Shubach *et al.*, 2017; Pinzón-Fernández, 2019). Para perpetuarse en las células infectadas, inhibe la acción de diversas vías apoptóticas, y también disminuye la expresión de genes supresores de tumores y aumenta la de algunos oncogenes, lo cual, en conjunto, favorece la aparición del cáncer (Pinzón-Fernández, 2019).

Diversas bacterias del orden *Mycoplasmatales*, como *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *U. parvum* se relacionan con mayor riesgo de infección por VPH, y en particular con la infección por cepas de alto riesgo oncogénico del VPH (genotipos 16, 18, 31, 33 y 35, entre otros) y resultados anormales en citologías cervicales. Dicha relación se explica por la inducción de citocinas proinflamatorias y por una alteración en los patrones de expresión de diversos oncogenes y genes supresores de tumores debido a la infección por estas bacterias (Guijón *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2018; Klein *et al.*, 2019; Torcia, 2019)

Aquí hay que resaltar que la dominancia de *Lactobacillus* parece ser característica única del ser humano; en otros mamíferos estudiados a la fecha la

abundancia de estas especies ronda el 1% (Miller et al., 2016). Bacterias como *Gardnerella*, *Sneathia* y *Prevotella* tienen una alta prevalencia en primates no humanos, encontrándose similitudes entre el microbioma de macacos cangrejeros (*Macacca fascicularis*) y el CST IV-A del humano (Miller et al., 2016; Nugre et al., 2019). En el perro, los géneros predominantes en el microbioma vaginal son *Ralstonia*, *Hydrothalea* y *Mycoplasma*; en el cuy (*Cavia porcellus*) los géneros *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Aerococcus*, *Facklamia* y *Allobaculum* son los que predominan; mientras que la microbiota genital de la vaca y de ovejas contiene a *Aggregatibacter*, *Streptobacillus* y *Phocoenobacter* como las bacterias más abundantes (Swarts et al., 2014; Neuendorf et al., 2015; Lyman et al., 2019).

Otra diferencia importante entre el ambiente vaginal humano y el de otras especies es el pH, que en mujeres sanas se mantiene inferior a 4, mientras que, en vacas, cabras, ovejas, ratas grises, cujos, hámsters y el perro está por encima de 6.5 (Martín et al., 2008; Miller et al., 2016). Solo el babuino de Anubis (*Papio anubis*) y el chimpancé (*Pan troglodytes*) presentan un pH vaginal cercano a 6, con valores similares a los del humano con vaginosis bacteriana (Miller et al., 2016).

Diversas hipótesis han sido formuladas para explicar estas diferencias, la mayoría no tienen aún sustento experimental (Miller et al., 2016). Se sugiere que la dominancia de *Lactobacillus* fue seleccionada a lo largo de la evolución al conferir protección del microambiente vaginal del humano, mientras que en otras especies se dieron mecanismos similares, pero independientes de la colonización de especies de *Lactobacillus* (Miller et al., 2016). Otra hipótesis propone que el surgimiento de la agricultura, la cocción de los alimentos y los altos niveles de amilasa en la saliva permitieron al ser humano tener una dieta alta en almidón, lo que facilitó la acumulación de glucógeno en diversos tejidos, entre ellos el epitelio vaginal; favoreciendo así la proliferación de *Lactobacillus* (Miller et al., 2016)

Microbioma núcleo

La idea de un núcleo microbiano o microbioma central, denominado “core

microbiome” en inglés, surge para intentar explicar la gran variación en la composición de las comunidades microbianas entre individuos en comparación con la homogeneidad funcional de dichas comunidades (Valderrama, 2017). El microbioma núcleo se puede definir como el conjunto de miembros compartidos entre poblaciones microbianas en hábitats similares (Shade y Handelsman, 2012). Basándose en conceptos ecológicos tradicionales, se han propuesto algunas pautas para definir qué miembros de una comunidad corresponden al microbioma núcleo (Shade y Handelsman, 2012).

El núcleo de membresía corresponde a aquellas unidades taxonómicas operacionales (OTUs) o variantes de secuencia de amplicón (ASVs) compartidos por un cierto porcentaje de individuos en la población de estudio (Shade y Handelsman, 2012; Valderrama, 2017), siendo estas últimas las que se utilizarán en el presente estudio, debido a su mayor resolución, reproductibilidad para futuros estudios y por no estar limitados por la falta de bases de datos de referencia completas (Callahan et al., 2017). El porcentaje usado como criterio para definir a un ASV como perteneciente al núcleo de abundancia varía según los autores, desde un 50% hasta un 95% (Tap et al., 2009; Valderrama, 2017).

Otro concepto importante es el núcleo de composición, que se refiere a aquellos OTUs/ASVs que tienen un cierto intervalo de abundancia en los individuos estudiados (Shade y Handelsman, 2012; Valderrama, 2017). Esto permite dilucidar el rol de especies raras, comunes y dominantes en el ecosistema bacteriano (Shade y Handelsman, 2012; Valderrama, 2017). El núcleo de membresía-composición se refiere a los OTU's/ASV's que cumplen las restricciones tanto de prevalencia como de abundancia (Valderrama, 2017).

También se propone el concepto de núcleo filogenético, que ya no consistiría en especies (OTUs/ASVs), sino de linajes comunes a los individuos en el estudio, por lo que los núcleos bacterianos existirían en niveles evolutivos diferentes a la especie (Shade y Handelsman, 2012; Valderrama, 2017). Esto parte

de la suposición de que dichos grupos compartirán rasgos ecológicos o funcionales (Valderrama, 2017). Esto no siempre sucede, pudiendo existir una gran diversidad funcional enorme entre miembros de un mismo clado, como el phylum *Proteobacteria*, que incluye bacterias heterótrofas, litótrofas y fotótrofas (Valderrama, 2017). Por otro lado, una función puede estar distribuida entre distintos grupos filogenéticos, como la fotosíntesis (Shade y Handelsman, 2012).

El cáncer

La palabra cáncer engloba a una variedad de alteraciones que tienen en común un desequilibrio entre los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular, que llevan al desarrollo de neoplasias malignas (Granados et al. 2013; Trigo y Valero, 2014). Una neoplasia es una masa de tejido que crece de forma descoordinada y excesiva con respecto al tejido normal, careciendo de finalidad y compitiendo por la energía (Trigo y Valero, 2014). La Organización Mundial de la salud (OMS, 2018) considera que casi una de cada seis defunciones en el mundo es debida al cáncer.

Para comprender el cáncer es indispensable conocer el ciclo celular. Este es el periodo entre dos mitosis sucesivas y se divide en las fases G₀, G₁, S, G₂ y M. La fase G₀ es de reposo, G₁ y G₂ son de crecimiento, en la S se sintetiza el ADN y la fase M es la mitosis; el paso de una fase a otra es controlado por distintos tipos de proteínas reguladoras (Medina y Martínez, 2009; Trigo y Valero, 2014). Existen tres puntos de control en que el ciclo se detiene para buscar y reparar errores en el DNA y los cromosomas: entre G₁ y S, entre S y G₂, y en la metafase de la mitosis (Medina y Martínez, 2009; Granados et al. 2013; Trigo y Valero, 2014).

Existen varios tipos de genes que controlan la replicación y muerte celular. Al funcionar correctamente pueden inhibir el desarrollo del cáncer, pero su disfunción o alteración puede llevar al desarrollo del cáncer (Granados et al. 2013; Trigo y Valero, 2014). Los principales genes involucrados son los proto-oncogenes,

los genes supresores de tumores, los genes reparadores de ADN y los que codifican la telomerasa (Granados et al. 2013; Dobson y Lascelles, 2014; Trigo y Valero, 2014). Algunos ejemplos de oncogenes, genes supresores de tumores y reparadores de ADN se enlistan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Algunos ejemplos de oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de ADN	
Oncogenes	
Gen	Función
ab1	Tirosin-cinasa, fosforila el extremo carboxilo de la RNA polimerasa II
erbA	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
erbB	Proteína transmembrana con actividad tirosin-cinasa
Fos	Factor de transcripción, forma complejos con miembros de la familia Jun
Myc	Factor de transcripción, se une al ADN con la proteína Max
Ha-ras y Ki-ras	Proteínas G
Sis	Factor de crecimiento
Src	Proteína de membrana asociada a receptores, con actividad tirosin-kinasa
Ets	Factor de transcripción, se une al ADN activado por la vía Ras
Genes supresores de tumores	
Gen	Función
Rb	Regulación del ciclo celular
p53	Regula replicación de ADN, proliferación celular y apoptosis
DCC	Codifica una proteína relacionada con moléculas de adhesión
APC	Inhibición de señales de transducción
WT1	Suprime transcripción de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento similar a insulina II
NF1	Regulador de la acción de <i>ras</i>
INK4	Regula el paso del ciclo celular en el punto de restricción de G1
KLF6	Regulación transcripcional
BRCA1	Regulación del ciclo celular y reparación de ADN
CDH1	Proteína de adhesión celular
TGF-R I y TGF-R II	Inhibidores de crecimiento
Genes reparadores de ADN	
Gen	Función
UNG, SMUG1, MBD4, TDG, OGG1	Reparación de escisión de bases
MGMT	Reversión directa de daño
MSH2, MSH3, MSH6	Reparaciones de errores de apareamiento, reconocimiento de bucles y errores
ADPRT	Protege de interrupciones de la hebra de ADN
XPC, RAD23B, CETN2, XPA, RPA1, RPA2, RPA3	Reparación de escisión de nucleótidos
Elaborada con información de Alonso y Morales-González, 1994; Cooper, 2000; Wood et al., 2001; Granados et al., 2013; Trigo y Valero 2014; Wang et al., 2018	

Los proto-oncogenes codifican para diversas moléculas involucradas en la proliferación y diferenciación celular, como factores de crecimiento y transcripción (Trigo y Valero, 2014). Si un proto-oncogén sufre una alteración, su función también puede hacerlo, transformándose entonces en un oncogén (Granados et al. 2013; Trigo y Valero, 2014). Las alteraciones pueden involucrar la producción de proteínas con una estructura y función anormal (oncoproteína) (Trigo y Valero, 2014); o cambios en la regulación de la expresión genética, con lo que se activan de manera sostenida, ignorando los estímulos reguladores (Granados et al. 2013; Trigo y Valero, 2014).

Los genes supresores de tumores regulan la proliferación celular, ya sea activando vías que conducen a la apoptosis o muerte celular programada, o bien deteniendo la progresión del ciclo celular (Granados et al. 2013; Trigo y Valero, 2014). La apoptosis es un mecanismo de regulación en el número de células, controlado por varias proteínas a través de tres vías principales: intrínseca, extrínseca y de la perforina/granzíma (Medina y Martínez, 2009). Un equilibrio entre proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas mantiene regulado este proceso (Granados et al., 2013). Las mutaciones en genes que codifican para estas proteínas pueden permitir la supervivencia de células que normalmente serían destruidas (Trigo y Valero, 2014).

El ADN puede sufrir diversos tipos de daño, tanto por agentes externos, como radiación UV o carcinógenos ambientales (hidrocarburos aromáticos, aflatoxina B1, contaminación ambiental); como por factores internos, tales como ROS producidas durante el metabolismo celular (Granados et al. 2013; Trigo y Valero, 2014; Dang, 2015). Diversos genes codifican proteínas que monitorean la estructura del DNA y reparan los errores que encuentren (Medina y Martínez, 2009; Granados et al. 2013). Al existir una mutación en alguno de estos genes, la célula es incapaz de reparar los daños en el ADN, generando inestabilidad genética (Granados et al. 2013).

Los telómeros son secuencias cortas y repetitivas de DNA, ubicados en los extremos de los cromosomas, que los protegen de la fusión y degradación, dándoles mayor estabilidad (Trigo y Valero, 2014). En cada división celular, los telómeros se van acortando, y al llegar a un nivel mínimo, pierden su función, con lo que los cromosomas se fusionan, llevando a la muerte celular; actuando como un reloj mitótico (Medina y Martínez, 2009; Trigo y Valero, 2014). El alargamiento de los telómeros solo es posible gracias a la enzima telomerasa, presente de manera normal solo en células germinales, y en bajos niveles en algunas progenitoras (Trigo y Valero, 2014). Algunas mutaciones pueden reactivar la telomerasa, con lo que las células pueden dividirse indefinidamente (proceso conocido como inmortalidad celular), a su vez incrementando las posibilidades de que se malignicen y se desarrolle el cáncer (Medina y Martínez, 2009; Trigo y Valero, 2014).

En ausencia de infecciones virales o bacterianas que puedan activar mecanismos pro-neoplásicos, se pueden ir acumulando mutaciones a lo largo de los años hasta que una célula normal se transforma y supera los mecanismos que controlan la proliferación (Medina y Martínez, 2009; Granados et al., 2013). Es por esto que el cáncer suele ser más frecuente conforme incrementa la edad. Además, diversos factores contribuyen a la acumulación de mutaciones, como radiación UV, otras radiaciones ionizantes y diversas sustancias químicas, así como productos propios del metabolismo (Medina y Martínez, 2009; Granados et al., 2013; Dang, 2015). En diversas etapas las células transformadas van adquiriendo características que les permiten sobrevivir y transmitir dichas características a sus células hijas; a estas características, Hanahan y Weinberg (2000) las denominaron “los marcadores característicos del cáncer”, los cuales se van adquiriendo en eventos sucesivos de mutación (Nunney y Muir, 2015).

Los marcadores característicos del cáncer son evasión de supresores de crecimiento, autosuficiencia en señales de proliferación, resistencia a la apoptosis, inducción de angiogénesis, activación de inmortalidad mitótica, y activación de invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000; Dobson y Lascelles, 2014).

Posteriormente fueron agregados dos marcadores más, desregulación energética, que permite a las células cancerosas obtener los nutrientes necesarios para su proliferación a expensas de células sanas; y evasión de la destrucción por parte del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011; Nunney y Muir, 2015). La alteración en la diferenciación podría ser otro marcador característico (Atkipis et al. 2015).

También se ha propuesto la existencia de dos “características habilitantes”, que facilitan la adquisición de los marcadores característicos: inestabilidad genómica y mutación, y promoción de inflamación tumoral. La primera característica directamente permite la aparición de los marcadores, al acelerar la tasa de mutación. Mientras que la segunda característica puede llevar a la alteración del microambiente alrededor de la neoplasia, haciendo que las células del sistema inmune provean al tumor de factores de crecimiento, ROS con potencial mutagénico, factores pro-angiogénicos, o enzimas que modifican la matriz extracelular y facilitan la invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011; Nunney y Muir, 2015)

Neoplasias: Clasificación y nomenclatura

De manera tradicional se suele dividir a las neoplasias en benignas y malignas. Esta división depende de diversas características de proliferación, efectos en el tejido adyacente y tendencia a invadir otros sitios, cercanos o lejanos (Dobson y Lascelles, 2014; Trigo y Valero, 2014). Para fines descriptivos es una clasificación útil; sin embargo, un solo tipo de neoplasia puede tener un gran abanico de comportamientos entre distintos individuos, o cambiar sus características a lo largo del tiempo en un individuo (Dobson y Lascelles, 2014; Trigo y Valero, 2014).

Una neoplasia benigna crece a un ritmo lento, y de manera expansiva, y puede estar rodeada de una cápsula de tejido fibroso. No suele tener efectos sobre tejidos adyacentes, a menos que alcance un tamaño tal que provoque necrosis por compresión. Además, está bien diferenciada y generalmente no tiene efectos

sistémicos. Por último, una neoplasia benigna no genera metástasis (Dobson y Lascelles, 2014; Trigo y Valero, 2014). En contraste, una neoplasia maligna crece de forma rápida y tiende a infiltrar el tejido adyacente. Suele causar necrosis o ulceración de los tejidos adyacentes, mientras que a nivel sistémico frecuentemente resulta una amenaza a la vida debido a su crecimiento destructivo y afectación a órganos vitales. Una neoplasia maligna está pobremente diferenciada, y las células alteradas son capaces de generar metástasis (Dobson y Lascelles, 2014; Trigo y Valero, 2014).

En cuanto a la nomenclatura, las neoplasias benignas se identifican con el sufijo –oma que se añade a la raíz de la célula de origen. Por otra parte, las neoplasias malignas pueden nombrarse de dos maneras, según su origen; a las que provienen de células mesenquimatosas se les agrega el sufijo –sarcoma, mientras que los tumores malignos de origen epitelial se identifican con el sufijo –carcinoma (Medina y Martínez, 2009; Granados et al., 2013; Trigo y Valero, 2014). Sin embargo, no en todos los casos se cumplen estas reglas; en algunos casos se usan nombres por costumbre, aunque no coincidan con las reglas citadas anteriormente (linfoma, en vez de linfosarcoma), que aluden más a características morfológicas que al origen de la neoplasia (papiloma), o usando epónimos (linfoma de Hodgkin). Las leucemias son neoplasias originadas en los órganos hematopoyéticos, y los linfomas se originan en los nódulos linfáticos (Granados et al., 2013).

Clasificación de lesiones epiteliales cervicales

El cáncer cervical es un tipo de cáncer de alta incidencia, reportando alrededor de 250,000 muertes por año a nivel mundial (Laniewsky et al., 2018). Una parte fundamental para su detección entre la población es la citología cervical (Nayar y Wilbur, 2015). Existen varios criterios diagnósticos para reportar los resultados en dichas citologías, pero el más extendido actualmente es el sistema Bethesda, el cual considera distintas categorías de acuerdo a las características celulares (Nayar y Wilbur, 2015):

- 1) Negativo a lesión intraepitelial: La muestra puede contener células escamosas, endocervicales y endometriales; también puede incluir la presencia de cambios celulares asociados a inflamación, radiación, cervicitis linfocítica y alteraciones asociadas al uso de DIU.
- 2) ASC: Células escamosas atípicas. Representa una condición un tanto ambigua, que incluye cambios no relacionados con infección por VPH y hallazgos que sugieren la presentación de una lesión escamosa subyacente, como radio núcleo/citoplasma (N/C), hiper cromasia, cromatina irregular y células multinucleadas.
- 3) ASCUS: Células escamosas atípicas de significado indeterminado. Cambios sugerentes a LSIL, pero insuficientes para una interpretación definitiva, incluyendo coilocitosis incompleta (Células con halo citoplasmático incompleto), cambios que sugieren efecto citopático de HPV.
- 4) ASC-H: Células escamosas atípicas, sin descartar HSIL. Presencia de células metaplásicas atípicas inmaduras, aglomeraciones celulares, reparación marcadamente atípica, atrofia severa, células pequeñas con radio N/C incrementada, hiper cromasia, cromatina irregular y formas nucleares anormales.
- 5) LSIL: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. Las células aparecen solas, o agrupadas en clusters o capas. Cambios celulares asociados a infección por HPV, displasia celular ligera, coilocitosis, citoplasma queratinizado, eosinofílico o más denso, anisocariosis, cromatina irregular y células bi o multinucleadas.
- 6) HSIL: Lesión escamosa intraepitelial de alto grado. Células agrupadas en capas o sincitios. Displasia moderada o severa, con células más pequeñas que en LSIL, marcado incremento de radio N/C, núcleos generalmente hiper cromáticos, con algunos normocromáticos o hipocromáticos con contorno nuclear irregular, anisocitosis, anisocariosis, nucleolos ausentes, citoplasma de apariencia inmadura o densamente queratinizado (Nayar y Wilbur, 2015).

Cáncer en vida silvestre

La multicelularidad es una de las transiciones evolutivas más importantes en la historia de la vida, pues permitió la expansión en formas de vida que anteriormente se basaban exclusivamente en las formas de vida unicelulares, gracias al desarrollo de nuevas características fisiológicas y de comportamiento que le dieron a los organismos multicelulares ventaja sobre las formas de vida unicelulares (Aktipis et al., 2015). Más que un evento único de evolución, la multicelularidad surgió de manera independiente en distintos grupos filogenéticos. Animales, ascomicetos, basidiomicetos, plantas terrestres y algunos grupos de algas representan cada linaje multicelular (Knoll, 2011; Niklas y Newman, 2013). Knoll (2011) distingue entre multicelularidad simple y compleja, esta última caracterizada por diferenciación en varios tipos celulares, adhesión y comunicación entre células, desarrollo de sistemas de transporte de nutrientes más allá de la difusión simple, y un desarrollo programado con organización tridimensional, donde algunas células no están en contacto directo con el medio exterior. La ventaja de la multicelularidad como forma de vida es la diferenciación celular y la especialización de tejidos. Sin embargo, esta requiere de coordinación estrecha y que la unidad de selección sea el individuo, no la célula (Knoll, 2011).

Existen características conocidas como los cinco cimientos de la multicelularidad compleja, que son necesarias para la cooperación entre distintas células y el éxito de un sistema multicelular. Dichas características son la inhibición de la proliferación, muerte celular controlada, mantenimiento del ambiente extracelular, división del trabajo y distribución de recursos. El cáncer, de varias formas, atenta contra estos cimientos, de tal manera que sus fallos pueden emparejarse con los marcadores característicos del cáncer (Aktipis et al., 2015). En otras palabras, podría decirse que una de las desventajas de la multicelularidad es la aparición del cáncer.

El cáncer ocurre en varios grupos de seres vivos (Aktipis et al., 2015;

Ducasse et al., 2015), incluyendo vertebrados, urocordados, cefalocordados, equinodermos, protóstomos, cnidarios, ascomicetos, y rodófitas (Aktipis et al., 2015). Además, en otros grupos de organismos multicelulares en los que el cáncer no se ha reportado, como plantas, bacidiomicetos, amebozoos, algas verdes y marrones, sí se han encontrado fenómenos similares al cáncer, caracterizados por una proliferación y diferenciación anormal (Aktipis et al., 2015).

Si bien para el humano y animales domésticos, la relevancia del cáncer en términos de mortalidad y morbilidad está bien documentada, en fauna silvestre no parece ser tan común ni tener un impacto poblacional tan marcado (McAloose y Newton, 2009; Browning et al., 2014; Ewald y Swain, 2015). Se suele dar mayor relevancia a otros factores como el parasitismo, la depredación y desnutrición como causas de muerte (Kokko y Hochberg, 2015). Sin embargo, el diagnóstico del cáncer en vida libre es complejo debido a la dificultad de monitorear individuos que en ocasiones residen en territorios extensos, el acceso complicado a muestras debido a obstáculos ambientales, pérdida de tejidos por descomposición, depredación o carroñeo, y la falta de técnicas de diagnóstico validadas para estas especies (McAloose y Newton, 2009). Incluso, los datos obtenidos de animales silvestres en cautiverio pueden no ser del todo exactos, y provocar confusión sobre la prevalencia real de cáncer en vida silvestre (Abegglén et al., 2015; Pessier et al., 2016)

Aun así, en algunas especies se ha reportado cáncer recurrente. Algunos ejemplos son los tumores faciales en el demonio de Tasmania, *Sarcophilus harrisii*, papilomatosis en el peramélido rayado occidental, *Perameles bougainville*, fibropapilomatosis en varias especies de tortugas marinas, una variedad de neoplasias en ballenas belugas, *Delphinapterus leucas*, del estuario de San Lorenzo y el CUG del lobo marino de California, *Zalophus californianus* (Browning et al., 2014, McAloose y Newton, 2009). En este último, la relevancia del CUG en términos de su prevalencia y similitud con una neoplasia del humano, lo llevó a ser propuesto como modelo para el estudio de la oncogénesis (Browning et al. 2015).

El carcinoma urogenital del lobo marino de California

Hasta 1974 solo se habían reportado siete casos de neoplasias en pinnípedos. Sin embargo, en la década de los 80 se detectó un carcinoma de células transicionales en el lobo marino de California. De 1979 a 1994 la prevalencia de esta patología fue del 18% (66/370) en individuos adultos y subadultos varados a los que se les realizó necropsia, en la costa de California, EEUU (Gulland et al., 1996). Dos décadas después, Deming et al. (2018) reportaron una prevalencia del 23% en 932 adultos varados entre 2005 y 2015.

Lipscomb et al. (2000) identificaron neoplasias intraepiteliales en vagina, cérvix, útero, pene y prepucio, y concluyeron que el origen del carcinoma debe ser genital, ya que las lesiones genitales presentan diferenciación glandular en hembras, más no en machos, imitando lo que pasa en tejido glandular sano. Debido a que la uretra se ve afectada en un 31% de sus casos de estudio, Colegrove et al. (2009a) consideran que el carcinoma debe considerarse de origen urogenital, aunque mencionan que no encontraron lesiones primarias en vejiga urinaria.

Colegrove et al. (2009a) caracterizan las neoplasias de manera similar al sistema ya establecido para lesiones genitales en seres humanos, considerando cuatro grados. El primero, de bajo grado, conocido como LGIL (por sus siglas en inglés: Low grade intraepithelial lesion), se caracteriza por una ligera displasia celular y proliferación confinada al tercio bajo del epitelio. El segundo es de alto grado, conocido como HGIL (por sus siglas en inglés: High grade intraepithelial lesion) y se caracteriza por displasia moderada a marcada y proliferación de células parabasales atípicas, involucrando de un tercio a todo el epitelio. El tercer grado implica invasión más allá de la membrana basal del epitelio, y el cuarto considera la presencia de tumores metastásicos. Deming et al. (2018) clasifica los casos en dos etapas, temprana y avanzada. En la etapa temprana se encuentran los individuos con carcinoma *in situ* o localmente invasivo y en la segunda, aquellos con carcinoma *in situ* y metástasis, carcinoma invasivo con metástasis, y animales donde no se identificó la lesión primaria, pero presentaban metástasis. De los individuos

estudiados por Deming et al (2018), el 22% presentaban un estadio temprano de cáncer, y el 78% un estadio avanzado.

El carcinoma urogenital del lobo marino de California comúnmente presenta metástasis en diferentes sitios. Son frecuentemente afectados linfonodos sublumbar, pulmón, hígado, útero, ovarios, riñón, vejiga urinaria, glándulas adrenales, mesenterio, mediastino, diafragma, bazo y uretra (Gulland et al., 1996; Lipscomb et al., 2000; Deming et al., 2018). En muchos individuos se encuentra hidronefrosis e hidroureter como consecuencia del agrandamiento de los linfonodos sublumbar (Gulland et al., 1996; Deming et al., 2018). Con menor frecuencia se hallan focos metastásicos en corazón, uréter, músculo esquelético, intestino, cerebro, tonsilas, aorta, pericardio, próstata, medula espinal, vértebras y pituitaria (Gulland et al., 1996; Lipscomb et al., 2000; Deming et al., 2018)

Los animales con estadios avanzados de cáncer presentan diversos signos clínicos, que incluyen la emaciación, anorexia, distintos grados de parálisis o paresia, distensión abdominal, hinchazón en aletas traseras, edema perineal, y con menor frecuencia prolapso rectal, vaginal o peneano, necrosis del pene y fístulas en la región sacra (Deming et al., 2018, Gulland et al., 1996). El carcinoma urogenital provoca la muerte del 95% de los lobos marinos que tienen estadios avanzados, mientras que en los estadios tempranos la muerte se asocia con intoxicación por ácido domoico, trauma, leptospirosis o neumonía, y el carcinoma es un hallazgo incidental en la necropsia (Deming et al., 2018). Resulta interesante el que se haya encontrado evidencia de LSIL en animales jóvenes, previos a la madurez sexual, por lo que se propone que la transformación epitelial puede iniciar en etapas tempranas, aunque otros factores interactúan para que se termine desarrollando el carcinoma (Barragán-Vargas et al., 2016; Browning et al., 2015). Entre estos factores se incluyen aspectos genéticos (Bowen et al., 2005; Acevedo-Whitehouse et al., 2003), la expresión de receptores hormonales (Colegrove et al., 2009b), altas concentraciones de contaminantes ambientales (Ylitalo et al., 2005) y la presencia de agentes infecciosos con potencial oncogénico (Lipscomb et al., 2000; King et al.,

2002; Buckles et al., 2007;).

Acevedo-Whitehouse et al. (2003) investigaron la relación entre la consanguinidad y la presencia de distintas clases de enfermedades, encontrando que los lobos marinos de California con carcinoma tenían un índice de consanguinidad mayor comparado a aquellos con otro tipo de padecimientos. Además, otro estudio encontró que los individuos que eran homocigotos para el microsatélite Pv11 tienen casi el doble de probabilidad de tener carcinoma en comparación con heterocigotos. Pv11 se localiza en el intrón 9 del gen HPSE2, que codifica a heparanasa 2 (HPA2), un producto análogo de heparanasa 1 (HPA1). HPA1 posee una actividad catalítica sobre heparan sulfato, de la que carece HPA2, aunque esta última posee mayor afinidad con el heparan sulfato (Browning et al., 2014). La expresión de HPA2 se asocia con varios tipos de cáncer en humanos y de manera semejante, se encontró expresión del gen en tejidos de lobos marinos con carcinoma urogenital (Browning et al., 2014).

Algunos genes del MHC clase II también tienen relación con el carcinoma. La familia de genes DRB (Zaca-DRB) está compuesta por al menos ocho loci, con variabilidad limitada y que pueden estar presentes en múltiples combinaciones (Bowen et al., 2004). Cada locus se identifica con una letra, de A hasta H. Se encontró una fuerte asociación entre la presencia del locus Zaca-DRB.A y la posibilidad de presentación del carcinoma (Bowen et al., 2005). Otro estudio encontró que la expresión de Zaca-DRB.D en leucocitos circulantes tiene un ligero efecto protector contra el desarrollo de células escamosas atípicas en el epitelio genital (Barragán-Vargas et al., 2016).

La proteína p53, producto del oncogén TP53, regula la proliferación celular, apoptosis, promueve la reparación del daño en el ADN y mantiene la estabilidad del genoma (Colegrove et al., 2009a; Browning et al., 2015). Algunos tipos de cáncer pueden desarrollarse por mutaciones o inactivación de p53, debido a la interacción con oncogenes virales. La proteína p53 tiene una vida media corta, que se

incrementa cuando ocurren mutaciones en su gen, facilitando su detección por inmunohistoquímica. La proporción de células positivas a p53 incrementa conforme aumenta el grado de las lesiones neoplásicas, y se encuentra tanto en lesiones intraepiteliales como en las metastásicas (Colegrove et al., 2009a). Ki67 es una proteína involucrada en la regulación del ciclo celular, que está ausente en células que no se están replicando y aumenta durante la mitosis, por lo que se usa para medir la proliferación celular de un tumor, con valor pronóstico y predictivo (Panal et al., 2014). El índice Ki67 en tejido de lobo marino de California se incrementa conforme aumenta el grado de las lesiones intraepiteliales, y es aún más alto en lesiones metastásicas (Colegrove et al., 2009a).

De forma normal hay expresión de receptores estrogénicos α (ER α) y de progesterona (PR) en los conductos eferentes, próstata, epitelio de la uretra, cuerpos cavernoso y esponjoso del pene y el glande en machos de lobo marino de California, y en útero, cérvix, vagina, epitelio ovárico y epitelio distal de la uretra en hembras (Colegrove et al., 2009b, 2009c). En las hembras hay cambios cíclicos en la expresión de ER α en el útero, siendo más alta en primavera, en la época de crianza y en el estro y más baja durante la diapausa embrionaria. La expresión de PR se mantiene sin cambios significativos en todas las etapas del ciclo (Colegrove et al., 2009b). Los receptores de estrógenos y progesterona se usan como marcadores pronósticos en algunos tipos de cáncer (Fernández y Bernet, 2002). La expresión de ER α disminuye e incluso desaparece en lesiones intraepiteliales, y en los focos de metástasis está ausente, mientras que la expresión de PR permanece sin cambios.

Algunos organoclorados (OC), como el DDT y los policlorobifenilos (PCB), pueden interaccionar químicamente con ER α y PR, provocando disrupciones hormonales (Colegrove et al., 2009a). Además, los OC se caracterizan por su metabolismo y excreción lentos, por lo que tienden a aumentar su concentración a lo largo del tiempo en la cadena trófica. Especies situadas en la cima de la misma, como el lobo marino de California, suelen acumular OC en cantidades considerables

al ingerir presas contaminadas (Le Boeuf et al., 2002; Randhawa et al., 2015; Ylitalo et al., 2005). Los OC pueden afectar a los animales de varias formas: Daño al ADN, inducción de proliferación celular, inmunosupresión, alteraciones del crecimiento y reproductivas (Le Boeuf et al., 2002; Ylitalo et al., 2005). Las hembras pueden transferir OC a sus crías durante la gestación y la lactancia (Greig et al., 2007; Ylitalo, et al., 2005). Se ha encontrado que individuos con mayores concentraciones de PCB en grasa subcutánea tienen mayor probabilidad de morir debido al carcinoma, y en general los altos niveles de PCB y DDT aumentan el riesgo de carcinoma (Randhawa et al., 2015; Ylitalo et al., 2005). Resulta interesante el que, en la Bahía de Todos Santos, Baja California, el Golfo de California y el Estrecho de Puget, Washington, los niveles de OC en la grasa y sangre de los lobos marinos son más bajos que en animales de la costa de California, EEUU (Del Toro et al., 2006, Niño-Torres et al., 2009, Randhawa et al., 2015). Esto podría explicar por qué en el Golfo de California no se han reportado casos de carcinoma urogenital, aunque sí se tiene evidencia de transformación pre-oncogénica (Barragán-Vargas et al., 2016) y estados de anergia inmune en algunas regiones (Peñin et al., 2019).

Lipscomb et al. (2000) encontraron evidencia de la presencia de un herpesvirus en lesiones epiteliales del prepucio de un lobo marino de California, y determinaron por PCR que se trataba de un nuevo gammaherpesvirus. Se pudieron observar en lesiones epiteliales, por medio de microscopía electrónica, cuerpos de inclusión característicos de infección por herpesvirus; además, se encontraron fragmentos amplificables de ADN de OtHV-1 en muestras de tumores urogenitales (Lipscomb et al., 2000; Buckles et al., 2007). Posteriormente se nombró como herpesvirus otarino 1 (OtHV-1), y se determinó que es cercano filogenéticamente al herpesvirus humano 8 (HHV-8) (King et al., 2002). Este virus ha sido detectado en otras especies, pero no parece ser prevalente el carcinoma urogenital en ellas. Por ejemplo, se reportó un caso de carcinoma urogenital en lobo fino austral (*Arctocephalus australis*); el carcinoma compartía características histológicas con las del carcinoma del lobo marino de California, además de un patrón de metástasis similar (Dagleish et al., 2012).

Muestreos a animales en vida libre en California y Washington, EEUU, encontraron prevalencias distintas entre hembras sexualmente maduras (22%), machos en la misma etapa (46%), y cachorros y juveniles (5.8%), por lo que existe una gran probabilidad de que el carcinoma urogenital se comporte como una enfermedad de transmisión sexual si el virus se transmite durante el coito (Buckles et al., 2007). Sin embargo, en el Golfo de California se reportan prevalencias similares, pero ante la ausencia de reportes de carcinoma en esta zona, junto a evidencias de una transformación pre-oncogénica, y a que se ha encontrado una prevalencia alta del OtHV-1 en epitelio genital de crías, se sugiere que este virus es común y pudieran ser otros los factores que conducen a que se desarrolle la enfermedad (Barragán-Vargas et al., 2016).

El potencial oncogénico de los papilomavirus es bien conocido para distintas especies animales, como el VPH involucrado en el cáncer cervical en humanos, el BPV (*Bovine Papillomavirus*), FcaPV (*Felis catus Papillomavirus*), CPV (*Canine Papillomavirus*) relacionados con carcinoma de células escamosas en sus hospederos (Laniewsky et al., 2018; Chang et al., 2020). En vida libre también se ha encontrado asociación entre el desarrollo de tumores e infección por papilomavirus en delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) y manatíes (*Trichechus manatus*) (Barragán-Vargas, 2015). Rivera et al. (2012) identificaron un nuevo *Papillomavirus*, nombrado como ZcPV-1, en lesiones proliferativas en la piel y el prepucio de dos leones marinos de California; posteriormente, Barragán-Vargas (2015) encontró una prevalencia del 10.06% en muestras de epitelio genital recolectadas en varias colonias del golfo de California y el Pacífico mexicano. Recientemente, ZcPV-1 se asoció con el desarrollo de carcinoma de células escamosas, y los coilocitos encontrados en las citologías con displasia celular son típicas de una lesión producida por una infección de *Papillomavirus* (Barragán-Vargas, 2015; Luff et al., 2018).

Se encontró una fuerte asociación entre el carcinoma y la presencia de

Streptococcus β -hemolíticos, pero solo en hembras, a pesar de que se aisló más frecuentemente en machos. Se especula que este microorganismo, junto con mediadores inflamatorios, podría tener un efecto promotor en la carcinogénesis, o alternativamente, que el carcinoma provee un ambiente alterado que favorece su crecimiento (Johnson et al., 2006). Otro estudio realizado en el Golfo de California encontró que en individuos con presencia simultánea de OthV-1 y *Streptococcus* β -hemolíticos es mayor el número de coilocitos, células que, como se mencionó antes, se consideran precancerosas y comunes en infecciones por *Papillomavirus* en humanos (Barragán-Vargas, 2013).

Los factores mencionados anteriormente permiten configurar un modelo teórico de la transformación oncogénica en el lobo marino de California (Fig. 1). En dicho modelo multifactorial, propuesto por Acevedo-Whitehouse (2018), se postula que el microbioma es uno de los factores que podría tener un papel en la regresión de estados precancerosos hacia la normalidad, y que un estado de disbiosis podría favorecer la transición hacia estados alterados del epitelio genital. Para evaluar esta posibilidad es necesario primero describir el microbioma de *Z. californianus*, antes de investigar el papel de las bacterias como cofactores en el desarrollo de la transformación epitelial genital. Hay algunos estudios, basados en cultivo bacteriano, donde se reportaron bacterias genitales del lobo marino de California, como *Edwarsiella*, *Leptospira*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Staphylococcus* (Higgins 2000), Mientras que Johnson et al. (2006) reportaron una abundancia de enterobacterias y otros bacilos Gram negativos, *Streptococcus* y *Staphylococcus*; semejante a lo reportado para otros mamíferos terrestres y marinos (D'Miranda, 2013; Higgins, 2000; Noguchi et al., 2004). Sin embargo, para caracterizar el microbioma genital, es necesario realizar estudios que permitan la detección no sesgada ni dependiente del cultivo de las especies bacterianas que lo integran, lo cual es el objetivo de la presente tesis.

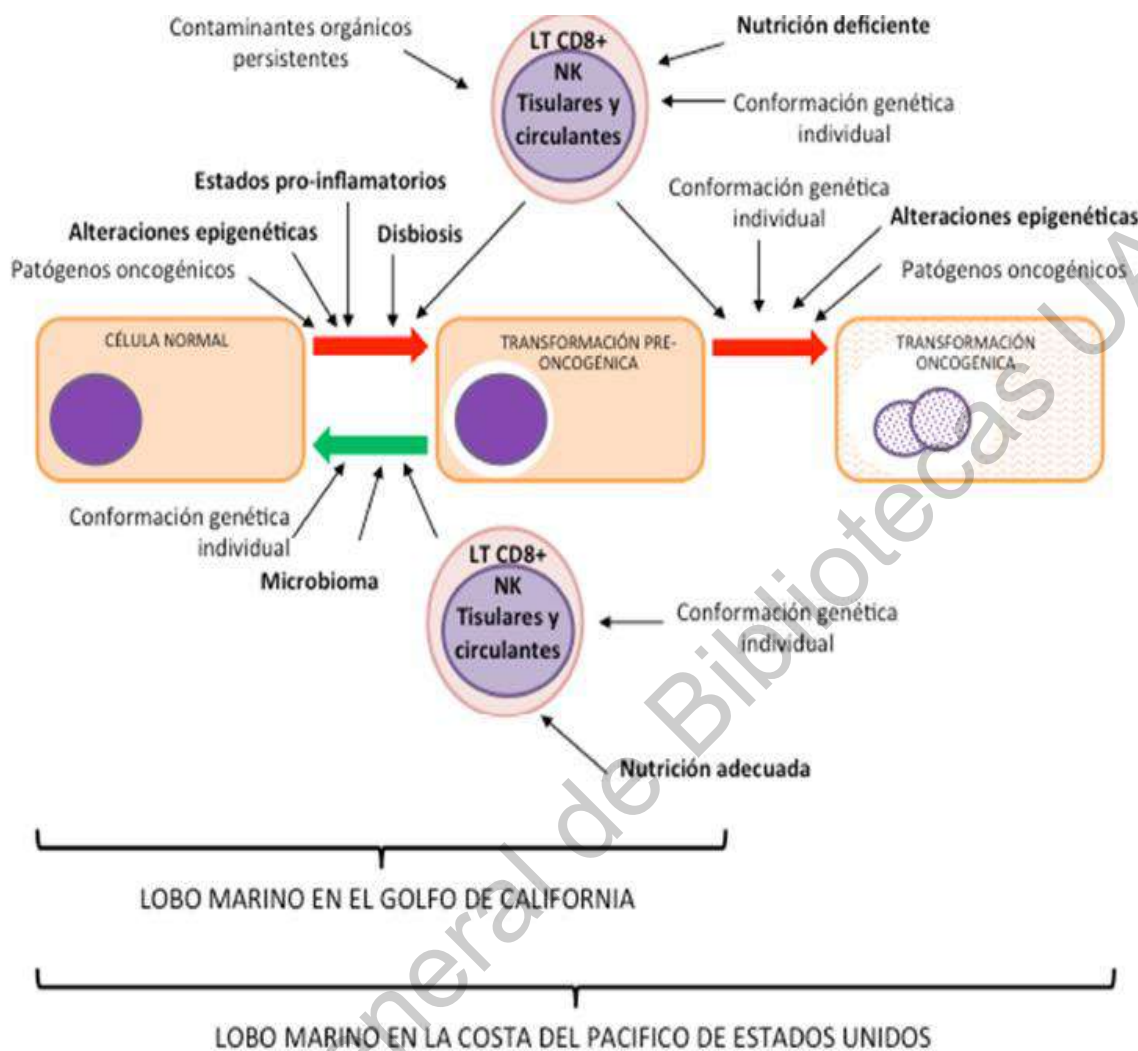


Fig. 1. Modelo propuesto de la transformación oncogénica del epitelio genital del lobo marino de California (Acevedo-Whitehouse, 2018. Etiología de la transformación oncogénica urogenital del lobo marino de California en aguas mexicanas)

JUSTIFICACIÓN

El papel de las bacterias comensalistas y mutualistas del tracto genital como cofactores en el desarrollo del carcinoma urogenital en el lobo marino de California se desconoce. Dada la relevancia que tiene el microbioma para la transformación cancerígena en el humano, es relevante identificar las bacterias que forman parte de la microbiota normal, y las que puedan estar asociadas a la presentación de este tipo de neoplasias. Las similitudes entre el cáncer cervicouterino en humanos y el carcinoma urogenital hacen de este último un buen modelo para entender mejor la influencia de los factores implicados en su desarrollo. Además, el lobo marino de California, como especie centinela, representa un modelo de estudio idóneo para comprender el desarrollo del cáncer en el contexto del cambio ambiental antrópico.

HIPÓTESIS

1. El microbioma cervical del lobo marino de California es semejante al microbioma cervical de los mamíferos carnívoros terrestres.
2. El microbioma cervical del lobo marino de California difiere entre regiones ecológicas en el Golfo de California.
3. El microbioma cervical del lobo marino de California difiere entre hembras adultas con epitelio sano y hembras adultas con epitelio con transformación pre-oncogénica.
4. El microbioma cervical del lobo marino de California difiere entre hembras adultas infectadas con virus oncogénicos y hembras que no presentan infección con dichos virus.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

OBJETIVOS

General

Caracterizar el microbioma cervical de hembras adultas de lobo marino de California en el contexto de la transformación epitelial cervical.

Específicos

1. Comparar el microbioma cervical de hembras adultas de lobo marino de California con el microbioma de otros mamíferos carnívoros.
2. Dilucidar si existen patrones diferenciales en las comunidades del microbioma cervical del lobo marino de California en las distintas regiones ecológicas del Golfo de California.
3. Determinar las diferencias en abundancia y ensamblaje del microbioma cervical de lobos marinos de California con epitelio sano y con transformación pre-oncogénica.
4. Investigar la asociación del microbioma cervical con la infección por virus de potencial oncogénico.
5. Identificar relaciones de co-ocurrencia entre los miembros de la comunidad bacteriana en hembras sanas, con transformación pre-oncogénica, e infectadas con virus oncogénicos

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta tesis se realizó con muestras que fueron colectadas en una expedición científica durante el verano de 2016 como parte del proyecto de investigación CONACYT-Fronteras de la Ciencia 446 “Patrones espacio-temporales de la diversidad de receptores antigénicos del lobo marino de California: una aproximación eco-inmunogenómica”. Se presenta brevemente la metodología utilizada para la colecta y análisis citológico de estas muestras. Toda la metodología molecular y análisis del microbioma corresponde a la presente tesis.

Especie de estudio

El lobo marino de California (*Zalophus californianus*), perteneciente a la familia Otariidae, es una de tres especies que comprenden el género *Zalophus*, junto con el lobo marino de las Galápagos (*Z. wolfebaeki*) y el extinto lobo marino japonés (*Z. japonicus*) (Heath y Perrin, 2008; Elorriaga-Verplancken et al., 2015). Su área de distribución abarca las costas del Pacífico de Norteamérica desde la Columbia Británica (Canadá), hasta la costa sudoeste mexicana (Szteren y Auriolles-Gamboa, 2011), aunque las colonias reproductivas se ubican en un área más restringida, que incluye las Islas del Canal en California, EEUU, algunas islas en las costas del Pacífico bajacaliforniano y las trece colonias del Golfo de California (Heat y Perrin, 2008; Szteren y Auriolles-Gamboa, 2011).

La temporada reproductiva va de junio a agosto, y las hembras paren un cachorro al año, entrando en celo después de dar a luz (Barragán-Vargas, 2013; Elorriaga-Verplancken et al., 2015). Los cachorros son destetados a los 10-12 meses de edad y llegan a la madurez sexual a los 5 años (Auriolles-Gamboa y Zavala-González, 1994; Heath y Perrin, 2008). Existe dimorfismo sexual marcado, teniendo las hembras un peso de 100 kg y 1.4 a 1.8 m de longitud aproximada, y los machos alrededor de 350 kg y 2 a 2.5 m de largo, contando además con una cresta sagital marcada (Auriolles-Gamboa y Zavala-González, 1994; Heath y Perrin, 2008).

Se alimentan de diversas presas, dependiendo de su disponibilidad, siendo las más comunes en el Golfo de California la anchoa (*Engraulis mordax*), la merluza norteña (*Merluccius productus*), pez piedra (*Sebaste spp.*) y los guardiamarinas (*Porichthys spp.*), aunque su dieta puede variar mucho dependiendo del año, la estación e incluso diferencias individuales, e incluir organismos como cangrejos y otros crustáceos, krill, pulpos y lampreas (Heath y Perrin, 2008, Barragán-Vargas, 2013). A partir de un máximo histórico de población estimada en el Golfo de California de 43,834 individuos en 1991 (rango de 34,080-58,274), esta ha ido decreciendo hasta los 15,291 (11,861-20,316) estimados en 2019 (Adame et al., 2020).

Colecta de muestras

Se utilizaron muestras de raspados de epitelio cervical de hembras adultas de *Z. californianus* que fueron colectadas durante el verano de 2016 en 12 colonias reproductivas ubicadas en el Golfo de California, México (Figura 2).

Las hembras fueron capturadas con ayuda de redes de malla, y luego fueron llevadas a un espacio de trabajo cercano al sitio de captura, donde se contuvieron de manera física o química (anestesia con isofluorano). Durante todo el proceso, las aletas se mantuvieron húmedas y se monitorearon los signos vitales, de acuerdo con las normas dictadas por la National Marine Fisheries Services (Dierauf y Gulland, 2001). Una vez hecha la contención, con ayuda de un espéculo se insertó cuidadosamente en el cérvix un cepillo citológico; con movimientos circulares se obtuvo una muestra de epitelio cervical. Se retiró el cepillo y se repitió el procedimiento con uno nuevo, para tener dos muestras por individuo. La muestra obtenida con el cepillo citológico se rodó sobre la superficie de dos laminillas. Las muestras fueron fijadas con un fijador citológico en aerosol. Los cepillos citológicos se almacenaron en microtubos estériles de 1.5 ml, uno con 700 µl de etanol al 96% y otro con 700 µl de solución amortiguadora de ARN (RNA later, Qiagen). Una vez en el laboratorio, ambas se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis.

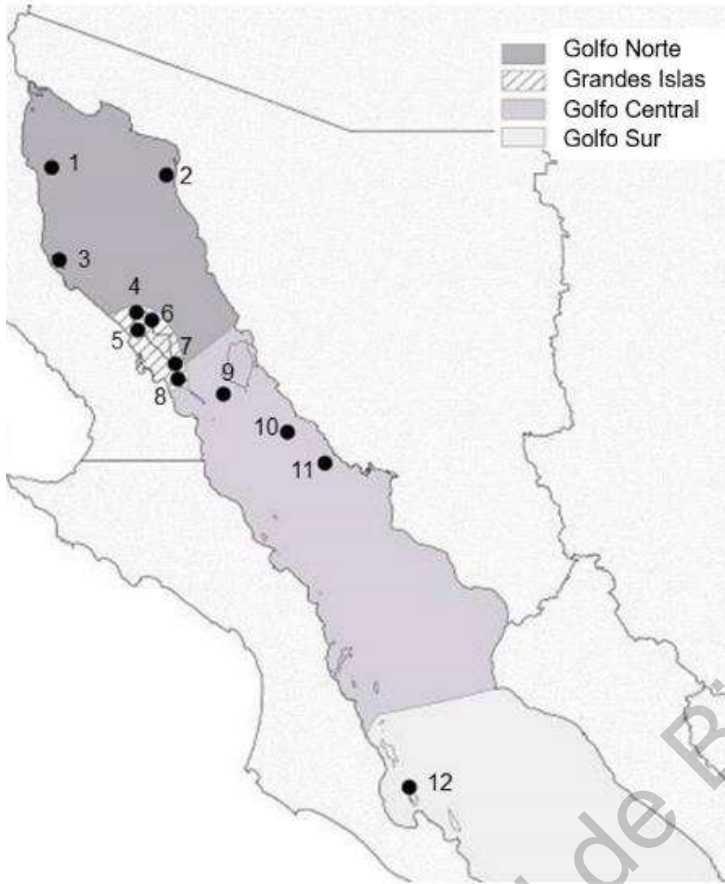


Figura 2. Mapa con las 12 colonias en donde se tomaron muestras durante el verano de 2016. La regionalización ecológica es la propuesta por Szteren y Auriolles-Gamboa (2011). Las colonias corresponden a:

- 1) Rocas Consag.
- 2) Isla San Jorge.
- 3) Isla Lobos.
- 4) Isla Granito.
- 5) Los Cantiles.
- 6) Los Machos.
- 7) El Partido.
- 8) El Rasito.
- 9) San Esteban.
- 10) San Pedro Mártir.
- 11) San Pedro Nolasco.
- 12) Los Islotes.

(Modificada de Peñin *et al.*, 2019)

Citologías

Una impronta de cada individuo fue teñida para evaluar el grado de transformación celular del epitelio genital, utilizando un protocolo de Papanicolau modificado (Barragán-Vargas *et al.*, 2016), descrito brevemente a continuación. Las laminillas se sumergieron sucesivamente por 30 segundos en cada caso, en etanol al 80%, etanol al 70%, etanol al 50% y agua destilada. Luego se tiñeron con hematoxilina de Harris por 4:30 minutos, se enjuagaron con agua destilada por 30 segundos y luego se sumergieron en HCl 0.25% seis veces, y a continuación en agua corriente por 6 minutos para eliminar el exceso de colorante. En seguida se sumergieron, de nuevo por 30 segundos en cada paso, en agua destilada, etanol al 50%, etanol al 70%, etanol al 80%, etanol al 95%; y se tiñeron con colorante OG6 por 90 segundos. Luego se volvieron a sumergir en etanol al 95% por 30 segundos, repitiendo este paso dos veces. Como última tinción se utilizó colorante EA-50 por

90 segundos y finalmente, por 30 segundos en cada reactivo, se sumergieron en etanol al 95%, etanol al 100%, solución de xilol-álcohol 1:1 y xilol al 100%.

Las laminillas se dejaron secar al aire y luego se cubrieron con un cubreobjetos, fijando con resina sintética a base de xilol al 60%, haciendo ligera presión al momento de colocar el cubreobjetos para evitar la formación de burbujas.

Los diagnósticos citológicos los realizó Cecilia Barragán Vargas en colaboración con el patólogo Germán Ávila Rosales del Instituto Mexicano del Seguro Social y Hospital San José Querétaro; tomando como base, dada la gran similitud a nivel celular, la clasificación Bethesda para diagnóstico de citologías cervicales en humanos (Barragan-Vargas, 2015; Nayar y Wilbur, 2015).

Extracción y secuenciación de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método propuesto por Barragán-Vargas (2015). Previo a la extracción se prepararon dos soluciones, una solución concentrada de NaCl 6M, además de 25 ml de solución de lisis, compuesta por los siguientes reactivos:

- 100 µl de EDTA 0.5M
- 250 µl de TRIS HCl 1M
- 500 µl de proteinasa-K
- 10 ml de SDS 5%
- 10 ml de solución NaCl 1M
- 4.15 ml de H₂O estéril.

Los tubos con los cepillos citológicos se mezclaron en vortex por 2 minutos para desprender todo el material orgánico, luego se centrifugaron por 2 minutos a 10,000 RPM, se sacó el cepillo pasándolo a otro tubo, y se volvió a centrifugar por 2 minutos a 10,000 RPM. El etanol se regresó al tubo con su correspondiente cepillo y el proceso siguió con la pastilla que se acumuló al fondo del tubo. Se agregaron

500 µl de solución de lisis a cada tubo y se mezcló inmediatamente por inversión durante 8 segundos, para incubar por una hora a 58 °C. Al terminar la incubación se agregó a cada tubo 300 µl de solución NaCl 6M, mezclando inmediatamente por inversión durante 8 segundos; luego los tubos se centrifugaron a 13,000 RPM por 30 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 700 µl de isopropanol, se mezcló y se pusieron a incubar por una hora a -20 °C. Se volvió a centrifugar a 13,000 RPM por 20 minutos, y luego se retiró con cuidado el sobrenadante, quedando la pastilla con ADN al fondo del tubo. Se agregaron 200 µl de etanol al 70% lentamente, y se centrifugó por última vez a 13,000 RPM por 3 minutos. Luego se decantó cuidadosamente el etanol, y se dejó secar el tubo a temperatura ambiente. Al final se resuspendió el ADN en 50 µl de H₂O estéril, y las muestras obtenidas se refrigeraron a -20 °C hasta su utilización.

La concentración y calidad del ADN se evaluó con un espectrofotómetro NanoDrop® (Valderrama, 2017). Se realizó una amplificación por PCR del gen 16S rRNA bacteriano para confirmar la viabilidad de las muestras, usando los *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTG TTACGA CTT-3') (Ni et al., 2015). El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) 94 °C por 3 minutos
- 2) 25 ciclos de:
 - a. 94 °C por 45 segundos
 - b. 60 °C por 30 segundos
 - c. 72 °C por 2 minutos
- 3) 72 °C por 10 minutos
- 4) 4 °C hasta análisis

El producto de PCR se corrió por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, confirmando la presencia de un fragmento de 1500 pb, correspondiente al tamaño

del gen 16S rRNA. Las muestras positivas a la amplificación del gen 16S rRNA se enviaron a la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en la Ciudad de México, donde se secuenciaron las regiones V3-V4 en la plataforma MiSeq de Illumina® (Valderrama, 2017; Valenzuela-González et al., 2015).

Con base en estos procedimientos, se determinó que del total de muestras obtenidas durante la expedición de campo de 2016, solamente 23 muestras eran adecuadas para realizar la secuenciación. Para todas estas muestras se contaba con un diagnóstico citológico y datos sobre la infección con virus potencialmente oncogénicos (OthV-1 y ZcPV-1). En el Cuadro 2 se presentan los datos de estas 23 muestras. Estas se enviaron a la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en la Ciudad de México, donde se secuenció el fragmento correspondiente a las regiones V3-V4 del gen 16S rRNA en la plataforma MiSeq de Illumina®

Cuadro 2. Datos de los individuos de <i>Z. californianus</i> incluidos en el estudio						
ID	Colonia	Región ecológica	Diagnóstico de OthV-1	Diagnóstico de ZcPV1	Grado de Inflamación	Diagnóstico citológico
16RC01AG	Rocas Consag	Golfo Norte	+	+	Moderada	LSIL
16RC02AG	Rocas Consag	Golfo Norte	+	+	Moderada	LSIL E
16SJ01AG	Isla San Jorge	Golfo Norte	+	-	Moderada	LSIL
16SJ02AG	Isla San Jorge	Golfo Norte	+	+	Moderada	N
16SJ07AG	Isla San Jorge	Golfo Norte	+	+	Alta	ASC
16LO03AG	Isla Lobos	Golfo Norte	+	-	Alta	ASC
16RA01AG	El Rasito	Golfo Central	+	-	Negativo	N
16RA03AG	El Rasito	Golfo Central	+	+	Moderada	ASCUS
16SE02AG	San Esteban	Golfo Central	+	+	Moderada	ASC
16SE03AG	San Esteban	Golfo Central	+	-	Moderada	N
16SN01AG	San Pedro Nolasco	Golfo Central	+	-	Moderada	ASC
16SN02AG	San Pedro Nolasco	Golfo Central	+	+	Moderada	ASC
16SPM02AG	San Pedro Mártir	Golfo Central	+	-	Moderada	LSIL
16SPM03AG	San Pedro Mártir	Golfo Central	+	-	Moderada	ASC
16CA01AG	Los Cantiles	Grandes Islas	-	+	Alta	ASC
16CA02AG	Los Cantiles	Grandes Islas	-	-	Alta	ASC
16GR02AG	Isla Granito	Grandes Islas	-	+	Alta	N
16GR03AG	Isla Granito	Grandes Islas	-	-	Moderada	LSIL
16MA01AG	Los Machos	Grandes Islas	+	+	Moderada	N
16MA02AG	Los Machos	Grandes Islas	+	+	Alta	ASC
16MA05AG	Los Machos	Grandes Islas	+	-	Negativo	N
16IS01AG	Los Islotes	Golfo Sur	+	+	Moderada	N
16IS05AG	Los Islotes	Golfo Sur	-	+	Alta	N

Análisis bioinformáticos y estadísticos

Las secuencias crudas fueron subidas a la plataforma web de Galaxy, y con la ayuda de la herramienta Cutadapt se eliminaron adaptadores de Illumina y lecturas con baja calidad (*Quality score* <20) (Martin, 2011; Afgan et al., 2018). Luego estas secuencias fueron cargadas en el programa R (R Core Team, 2019) con el entorno gráfico RStudio (RStudio Team, 2019). Con el paquete DADA2 se realizó un análisis de calidad de las secuencias; se recortaron los primeros 10 pb en las secuencias *forward* y *reverse*, y a partir de las 240 pb en las secuencias *forward* y 220 pb en los *reverse* (Castro-Nallar et al., 2019). Posteriormente se hizo un nuevo filtrado para eliminar secuencias con más de 0 bases indeterminadas, más de 2 errores de secuenciación y secuencias pertenecientes al control interno de Illumina®; luego se hizo la inferencia de ASVs y se removieron las secuencias quiméricas (Callahan et al., 2016; Castro-Nallar et al., 2019).

A continuación, se realizó la identificación taxonómica, utilizando la base de datos Silva rRNA versión 138 (Quast et al., 2013); en algunos casos se utilizó la plataforma en línea de BLAST para alinear las secuencias obtenidas con secuencias del gen 16S rRNA disponibles en la base de datos del NCBI y tratar de mejorar la identificación taxonómica obtenida con SILVA rRNA (Zhang et al., 2000; Callahan et al., 2016). Con phyoseq se eliminaron los ASV's identificados como eucariotas, cloroplastos y mitocondrias (McMurdie y Holmes, 2013).

Con ranacapa (Kandlikar et al., 2018) se calcularon las curvas de rarefacción para cada una de las muestras. Para comparar la diversidad alfa se suelen utilizar índices como el de Shannon, Simpson, Chao, entre otros (Castro-Nallar et al., 2019). La desventaja de estos índices es que cada uno ordena las comunidades de manera diferente, y dependiendo del que se utilice, va a ser más importante para el cálculo el número de especies o la abundancia relativa de cada una de ellas (Gómez, 2008; Jost, 2018). El índice de diversidad de Rényi permite comparar la diversidad entre comunidades a través de una curva, graficada con valores fijos de α y el valor de diversidad correspondiente (Gómez, 2008). Este

índice se comporta de la siguiente manera: cuando $\alpha=0$, el índice da el valor observado de especies, $\alpha=1$ es el índice de Shannon-Weaver, $\alpha=2$ es el índice de Simpson, y valores tendientes a infinito tienden al índice Berger-Parker (Gómez, 2008; Jost, 2018). La curva resultante se llama espectro de entropía de Rényi; si las curvas de dos o más comunidades no se cruzan, aquella que queda por encima posee una mayor diversidad mientras que, si sucede dicho cruce, el orden de diversidad es ambiguo y dependerá del índice de diversidad elegido (Gómez, 2008; Jost, 2018). Por estas características se eligió el espectro de índices de diversidad de Rényi para realizar las comparaciones en diversidad alfa en el presente trabajo, con la biblioteca BiodiversityR (Kindt y Coe, 2005) para calcular los perfiles de diversidad.

Con microbiome (Lahti y Shetty, 2018) se calculó el núcleo de abundancia y membresía (Kindt y Coe, 2005; Tap et al., 2009). Con phyloseq y vegan se calcularon las distancias entre muestras con Bray-Curtis, y la matriz resultante se usó para hacer un análisis de Coordenadas Principales (PCoA), luego se realizó un PERMANOVA para determinar si había diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de acuerdo con su procedencia geográfica, presencia de virus oncogénicos y salud epitelial (Holland, 2008; Tap et al., 2009; McMurdie y Holmes, 2013; Oksane et al., 2019). Con DESeq2 (Love et al., 2014) se realizó el análisis de abundancia diferencial, para ver si existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos según la región geográfica de procedencia y la salud epitelial (Castro-Nallar et al., 2019).

También se modeló una red de co-ocurrencia microbiana. Antes de empezar con el modelado de la red, se hizo un filtrado dejando únicamente aquellos ASV's con abundancia igual o mayor al 0.01% en al menos una muestra (Lynch y Neufeld, 2015; Castro-Nallar et al., 2019). Con Spiec-Easi (Kurtz et al., 2020) se modeló la red y posteriormente se calcularon el *degree* y *betweenness* de la red, necesarios para identificar las especies clave (Lynch y Neufeld, 2015; Layeghifard et al., 2018; Castro-Nallar et al., 2019). Además se identificaron los módulos de la

red, la modularidad, y se hizo el modelado de la misma red anterior, pero ahora identificando cada módulo detectado (Castro-Nallar et al., 2019)

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1. Comparar el microbioma genital cervical de las hembras adultas de lobo marino de California con el microbioma de otros mamíferos carnívoros.

El esfuerzo de muestreo fue suficiente para tener medidas de diversidad alfa confiables (Castro-Nallar et al., 2019), como lo reflejan las curvas de rarefacción (Fig. 3). Se contabilizaron un total de 1,775 ASVs

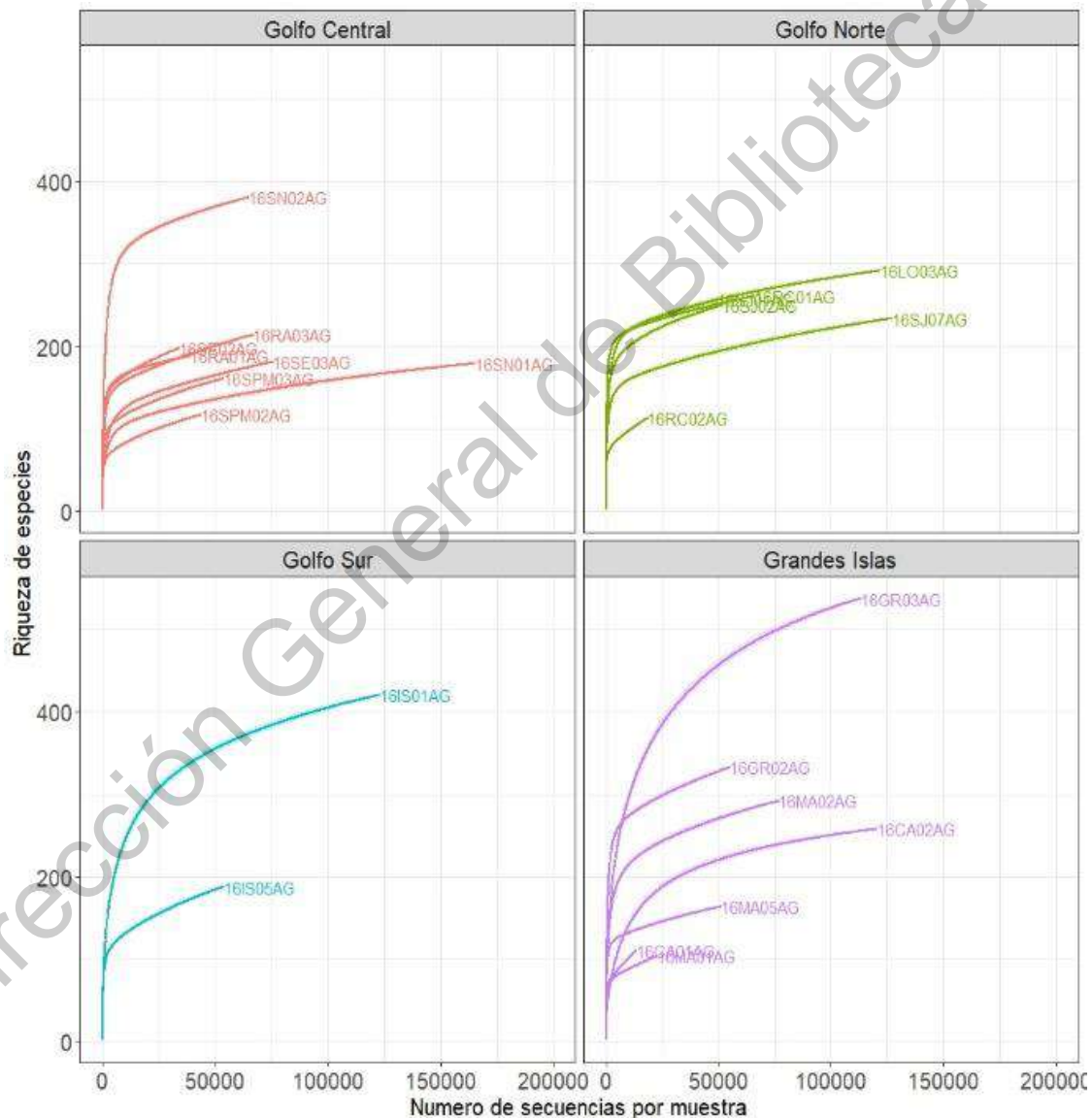


Figura 3. Curvas de rarefacción para las muestras incluidas en el estudio

La figura 4 muestra la abundancia relativa de las bacterias encontradas en las muestras, agrupadas a nivel de clase. Aquellas con una abundancia menor al 0.1%, es decir, las pertenecientes a la biósfera rara (Lynch y Neufeld, 2015), se agruparon en “otros”. *Fusobacteriia* y *Clostridia* están presentes en una proporción importante en todas las muestras: de 4.66% a 73.87% la clase *Fusobacteriia*, y de 9.42% a 69.4% la clase *Clostridia*. Bacterias pertenecientes a estos grupos taxonómicos también han sido encontradas en alta abundancia en análisis metagenómicos de la vagina de varios animales como: macacos cangrejeros, mangabeys, babuinos, chimpancés, lémures, cercopitecos, ovejas, vacas y perros domésticos (Swatz *et al.*, 2014; Yildirim *et al.*, 2014; Lyman *et al.*, 2019).

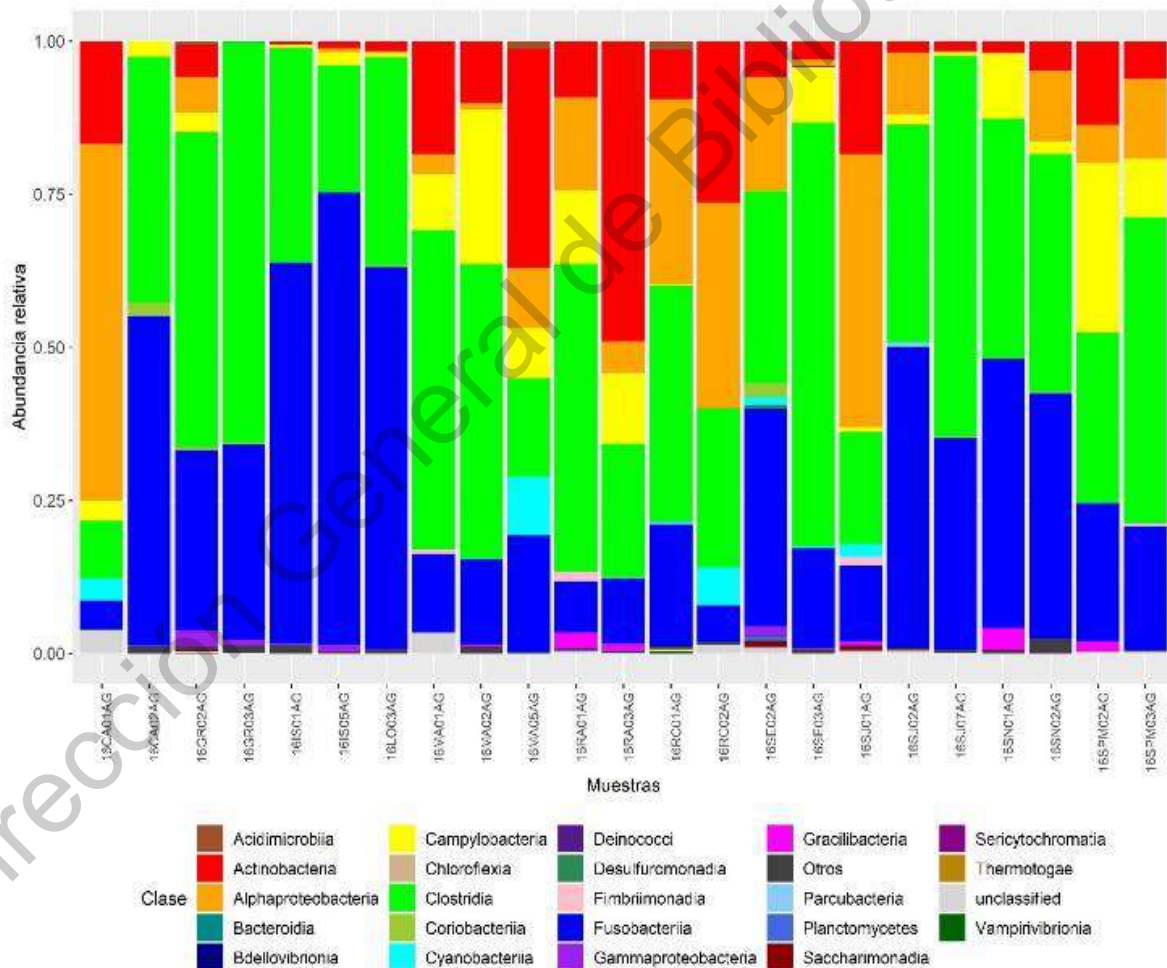


Figura 4. Gráfica de abundancias relativas de los hisopados del cérvix de hembras de *Zalophus californianus*, agrupadas por clase

Otras clases con abundancia importante fueron *Actinobacteria* (0.034%-49.11%), *Alphaproteobacteria* (0.075%-58.3%) y *Campylobacteria* (0.1%-27.66%), que también se han encontrado presentes en otras especies (Swatz *et al.*, 2014; Yildirim *et al.*, 2014; Lyman *et al.*, 2019). Algo a resaltar en este momento es que no se detectó ningún *Lactobacillus*, lo que contrasta con estudios previos, donde se había encontrado presente este género, aunque en baja abundancia, en el epitelio de otros animales aparte del humano (Miller *et al.*, 2016), aunque en todos estos casos, se trata de animales terrestres.

Microbioma núcleo

Tomando en cuenta únicamente la prevalencia en las muestras, no se encontró ningún ASV que tuviera una prevalencia del 100% (Fig. 5), y únicamente 94 ASVs estuvieron presentes en al menos el 50% de los individuos.

Quince ASVs tuvieron al menos una abundancia relativa del 10% en por lo menos una muestra, 215 alcanzaron por lo menos el 1% y 872 tuvieron abundancia de 0.1% en al menos una muestra; los restantes 903 ASVs se encontraron en abundancias relativas menores a 0.01% en todas las muestras.

Considerando una abundancia de al menos 0.01%, 57 ASVs tuvieron una prevalencia de por lo menos el 50%, solo dos ASVs tuvieron 90% de prevalencia y ninguno alcanzó el 100% a esta abundancia relativa. Considerando una abundancia de al menos 0.1%, 26 ASV's tuvieron una prevalencia del 50%, 17 estuvieron en el 60% de las muestras, ocho en el 70% y dos en el 80%; ningún ASV tuvo una prevalencia del 90% con esa abundancia.

Distintos autores consideran rangos de 50% a 95% para considerar que un ASV's es parte del núcleo de membresía (Tap *et al.*, 2009; Valderrama, 2017); y dado que en el presente estudio usar los intervalos más altos de prevalencia conlleva la exclusión de la mayor parte de la diversidad microbiana, un valor de

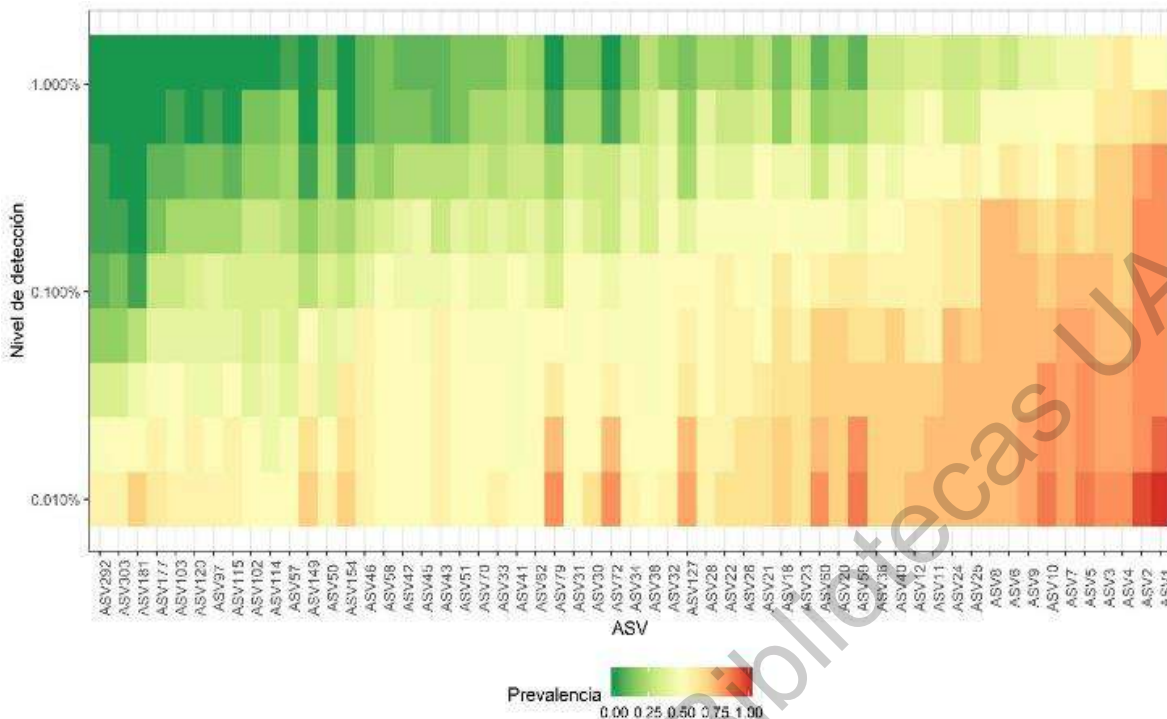


Figura 5. Gráfica que muestra los ASVs que tienen un mínimo de 50% de prevalencia en las muestras y al menos una muestra con una abundancia mínima de 0.01%, y su variación según se modifiquen los niveles de abundancia y prevalencia

50%, usado por Tap et al. (2009) parece ser un umbral adecuado para la inclusión en dicho núcleo. Con el núcleo de composición existe una situación similar en cuanto a la exclusión de la diversidad microbiana, por lo que se tomó como límite inferior una abundancia de 0.1%, que coincide con el límite superior de la llamada 'biósfera rara'. Este término hace referencia a los taxones bacterianos encontrados en abundancias muy bajas en los estudios metagenómicos, pero que al mismo tiempo representan una parte importante de la diversidad microbiana y cuya función aún no es del todo clara, aunque pueden jugar un papel en la resiliencia del microecosistema ante cambios ambientales (Lynch y Neufeld, 2015). Algunas bacterias pertenecientes a este grupo pueden transitoria o periódicamente pasar a ser más abundantes (Lynch y Neufeld, 2015). Por lo tanto, a partir de este momento, el microbioma núcleo hace referencia a ASV's con una prevalencia mínima del 50% y una abundancia mínima de 0.1% en al menos una muestra.

De los ASVs que pertenecen al microbioma núcleo, el 1, 2, 3, 4, 5 y 10

estuvieron presentes en al menos el 80% de las muestras, y al menos en una muestra su abundancia superó el 10%. Estos ASVs fueron clasificados como pertenecientes a los géneros *Fusobacterium*, *Oceanivirga* y *Campylobacter*. El resto de los ASV's del microbioma núcleo fueron identificados como pertenecientes a los géneros *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Helcococcus*, *Ezakiella*, *Lachnoclostridium*, *Peptoclostridium*, dos ASV como *Ruminococcaceae* UCG 005 y uno sin clasificar a nivel de género (Fig. 6). El Cuadro 3 indica la especie a la que más se parece la secuencia de cada uno de estos ASVs, junto con el porcentaje de identidad, de acuerdo con la herramienta en línea BLAST (Zhang et al., 2000).

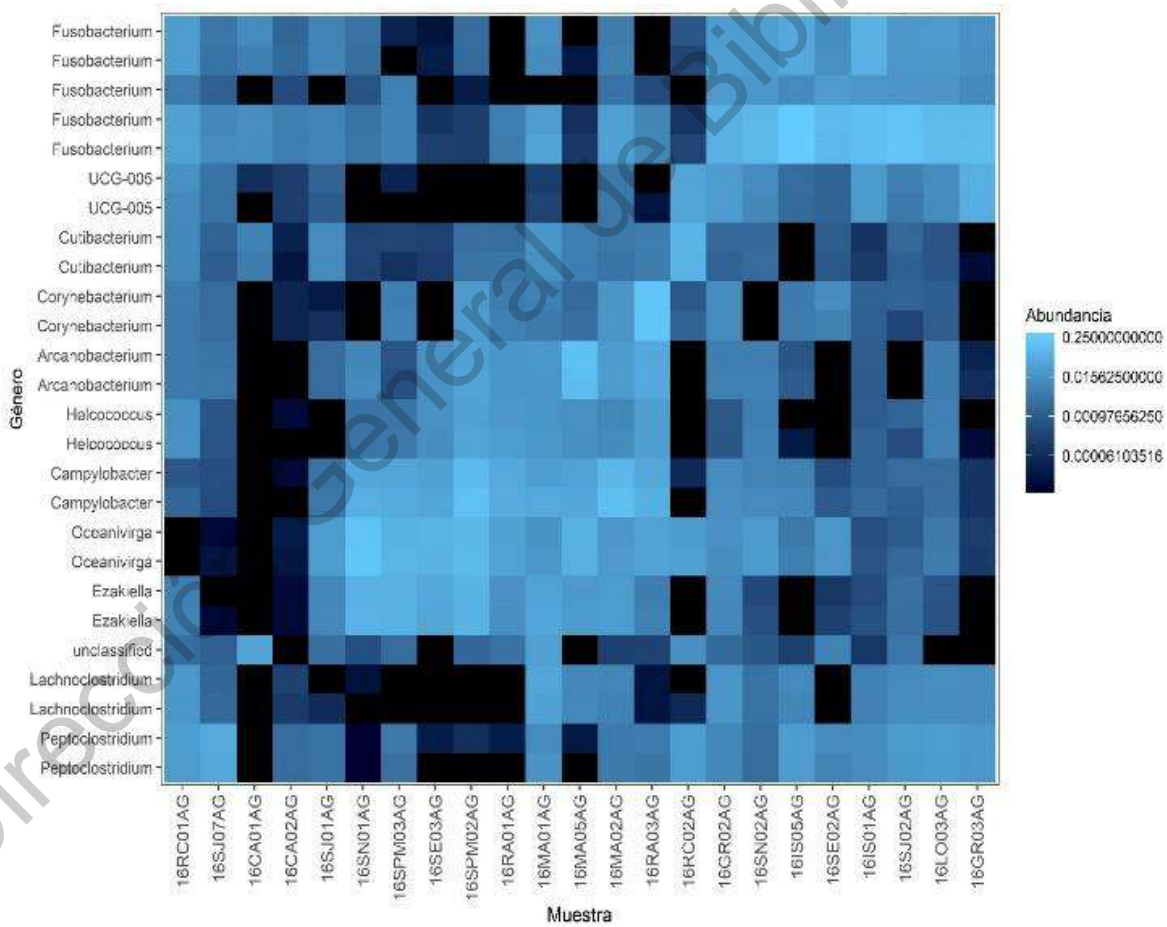


Figura 6. Microbioma núcleo, con abundancia de 0.1% y prevalencia de 50%

Cuadro 3. ASV's pertenecientes al microbioma núcleo de 50% de prevalencia y 0.1% de abundancia, y especies con las que tienen mayor similitud, de acuerdo a la herramienta en línea BLAST

ASV	Clase	Especie	Query coverage	e-value	Porcentaje de identidad
ASV1	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	100%	0	98.11%
ASV2	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	100%	0	97.87%
ASV3	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga salmonicida</i>	100%	6e-175	92.77%
ASV4	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga salmonicida</i>	100%	3e-173	92.54%
ASV5	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>	100%	0	94.54%
ASV6	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium hiranonis</i>	100%	0	100%
ASV7	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	100%	0	99.76%*
ASV8	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium hiranonis</i>	100%	0	99.76%
ASV9	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	100%	0	99.53%
ASV10	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>	100%	0	94.30%
ASV11	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella peruensis</i>	100%	0	98.57%
ASV12	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella peruensis</i>	100%	0	98.33%
ASV18	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium efficiens</i>	100%	0	98.36%
ASV20	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium efficiens</i>	100%	0	98.13%
ASV22	<i>Clostridia</i>	<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	100%	7e-174	92.45%
ASV23	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	100%	0	94.58%
ASV24	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium phocisimile</i> <i>Arcanobacterium phocae</i>	100%	0	99.06%**
ASV25	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium phocisimile</i> <i>Arcanobacterium phocae</i>	100%	0	99.30%**
ASV26	<i>Clostridia</i>	<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	100%	3e-172	99.22%
ASV28	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalimonas umbilicata</i>	100%	0	97.62%
ASV32	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalimonas umbilicata</i>	100%	0	97.38%
ASV36	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus seattlensis</i>	100%	0	99.83%
ASV40	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus seattlensis</i>	100%	0	98.10%
ASV59	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	100%	0	100%
ASV60	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	100%	0	99.76%
ASV127	<i>Sin clasificar</i>	Sin similitud significativa encontrada	-	-	***

* Este ASV fue clasificado hasta el nivel taxonómico de especie por Silva rRNA, y con BLAST se encontró mayor porcentaje de identidad con la misma especie.

** En estos dos ASV's se encontró el mismo porcentaje de identidad con la secuencia 16S de dos especies

*** No se encontró similitud significativa con ninguna secuencia en la base de datos debido a que la secuencia incógnita era demasiado corta.

El microbioma vaginal no ha sido tan ampliamente estudiado como el intestinal; aun así, existen datos de varias especies animales incluido el humano (Miller *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017; Lyman *et al.*, 2019). En carnívoros, grupo al que pertenece el lobo marino de California, solo existen datos del microbioma vaginal en el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) y el panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) (Yang *et al.*, 2017; Lyman *et al.*, 2019). De las bacterias incluidas en el microbioma núcleo de *Z. californianus*, las hembras de *C. l. familiaris* comparten *Fusobacterium* y *Corynebacterium*, y las hembras de *A. melanoleuca* a *Corynebacterium* (Yang *et al.*, 2017; Lyman *et al.*, 2019). Sin embargo, en las pandas gigantes son los géneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Streptococcus* y *Lactococcus*, entre otros, los más abundantes, mientras que en *C. l. familiaris* los géneros más abundantes son *Hydrotaea*, *Ralstonia*, *Mycoplasma*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* y *Porphyromonas* (Yang *et al.*, 2017; Lyman *et al.*, 2019). No puede ignorarse que los factores ambientales a los que se enfrenta el hospedero son importantes para la conformación del microbioma (Musheglan *et al.*, 2019), aunque la filogenia también es un factor importante; conociéndose como filo simbiosis a los patrones de co-evolución en que el árbol filogenético del hospedero es paralelo con el de las correspondientes comunidades bacterianas (Bik *et al.*, 2016; Ross *et al.*, 2019). Así que en este caso, es probable que tanto el hecho de haberse adaptado al ambiente acuático desde hace varios millones de años, como la evolución divergente, sean factores para configurar la microbiota única de esta especie.

Objetivo 2. Dilucidar si existen patrones diferenciales en las comunidades del microbioma cervical del lobo marino de California en las distintas regiones ecológicas del Golfo de California.

En las muestras de la región Golfo Sur hubo una menor diversidad que en las otras regiones ecológicas (Fig. 7). En términos de la diversidad beta, en el PERMANOVA se encontraron diferencias entre regiones ecológicas (Fig. 8) ($F = 1.7478$, $R^2 = 0.020943$, $P = 0.0097$), siendo menor la diversidad en los lobos marinos del sur.

En términos de la abundancia de las ASV's del microbioma de las hembras adultas, esta varió entre región ecológica. Específicamente, se encontraron diferencias significativas en ASV's clasificados en ocho clases: *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Campylobacteria*, *Clostridia*, *Cyanobacteriia*, *Fusobacteriia*, *Gammaproteobacteria*, y *Gracilibacteria* (Fig. 9). Algunos de estos ASVs fueron identificados como parte del microbioma núcleo, como *Oceanivirga*, *Helcococcus* y *Fusobacterium*. Otros, como *Nesterekonia*, *Pleurocapsa*, o *Sphingomonas*, se han encontrado en diversos ambientes marinos y terrestres (Son et al., 2013; Chander et al., 2017; Shalygin et al., 2019).

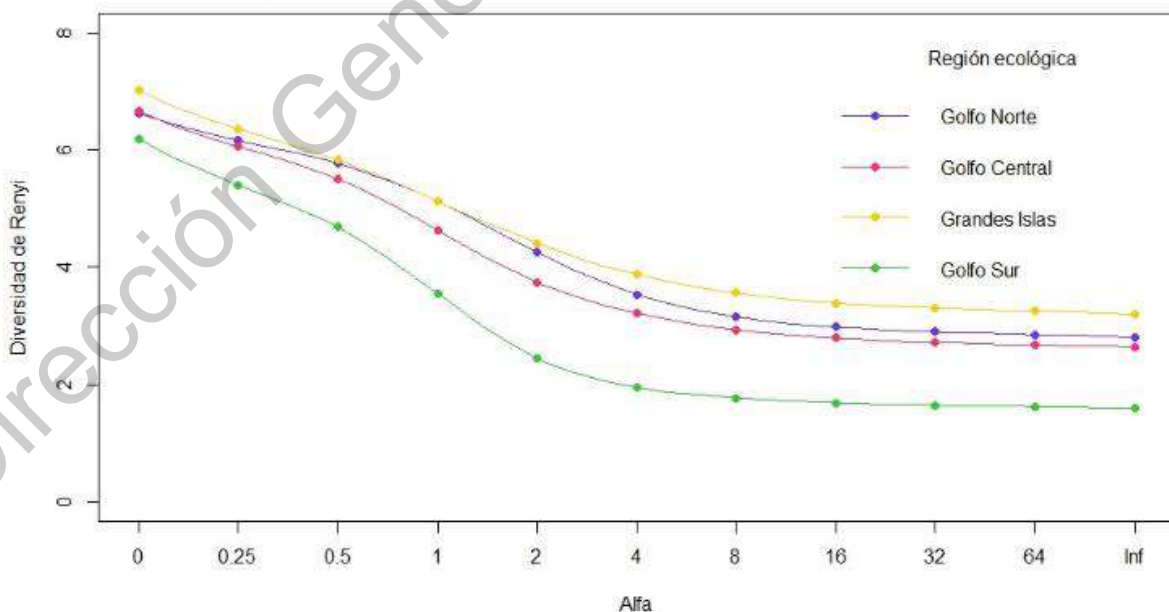


Figura 7. Espectros de entropía de Rényi agrupados por región ecológica, de acuerdo a la regionalización propuesta por Szteren y Auroles-Gamboa (2011)

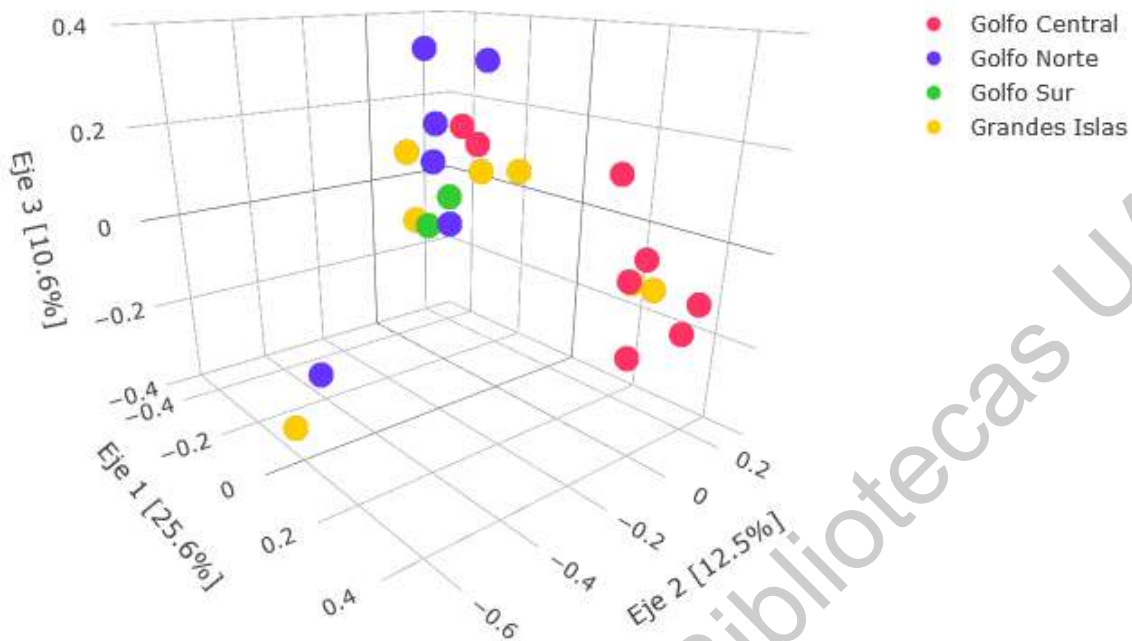


Figura 8. Análisis de PCoA de las muestras de epitelio genital de hembras adultas de *Zalophus californianus*, agrupadas por región ecológica.

Nesterekonia, *Pleurocapsa* y *Roseovarius* fueron más abundantes en el epitelio cervical de hembras de la región del Golfo Norte (Cuadro 4); *Oceanivirga*, *Peptoniphilus* y *Celeribacter* en las del Golfo Central; *Anaerobiospirillum*, *Chroococcidiopsis* y *Oceaniovalibus* en las de las Grandes Islas; y *UCG 005* y *Fusobacterium* en las hembras del Golfo Sur. *Falsirhodobacter* fue más abundante en dos regiones, Golfo Norte y Grandes Islas (Cuadro 5), *Phreatobacter* y *Micrococcus* fueron más abundantes en el Golfo Norte y Golfo Central, y *Tuzzerella* en Golfo Central y Grandes Islas. Por otra parte, *Anaerococcus* y *Fastidiosipila* fueron menos abundantes en las hembras del Golfo Norte (Cuadro 6); y *Clostridium sensu stricto*, *Fournierella*, *Peptoclostridium* y *Lachnoclostridium* lo fueron en hembras del Golfo Central; y *Sphingobium*, *Methilobacterium*, *UBA1819* y *Sphingomonas* fueron menos abundantes en hembras del Golfo Sur.

Las diferencias inter-espaciales en diversos aspectos de la ecología del lobo marino de California ya han sido reportadas. Esto llevó a que fuera propuesta la regionalización de las colonias reproductivas del lobo marino en el golfo de

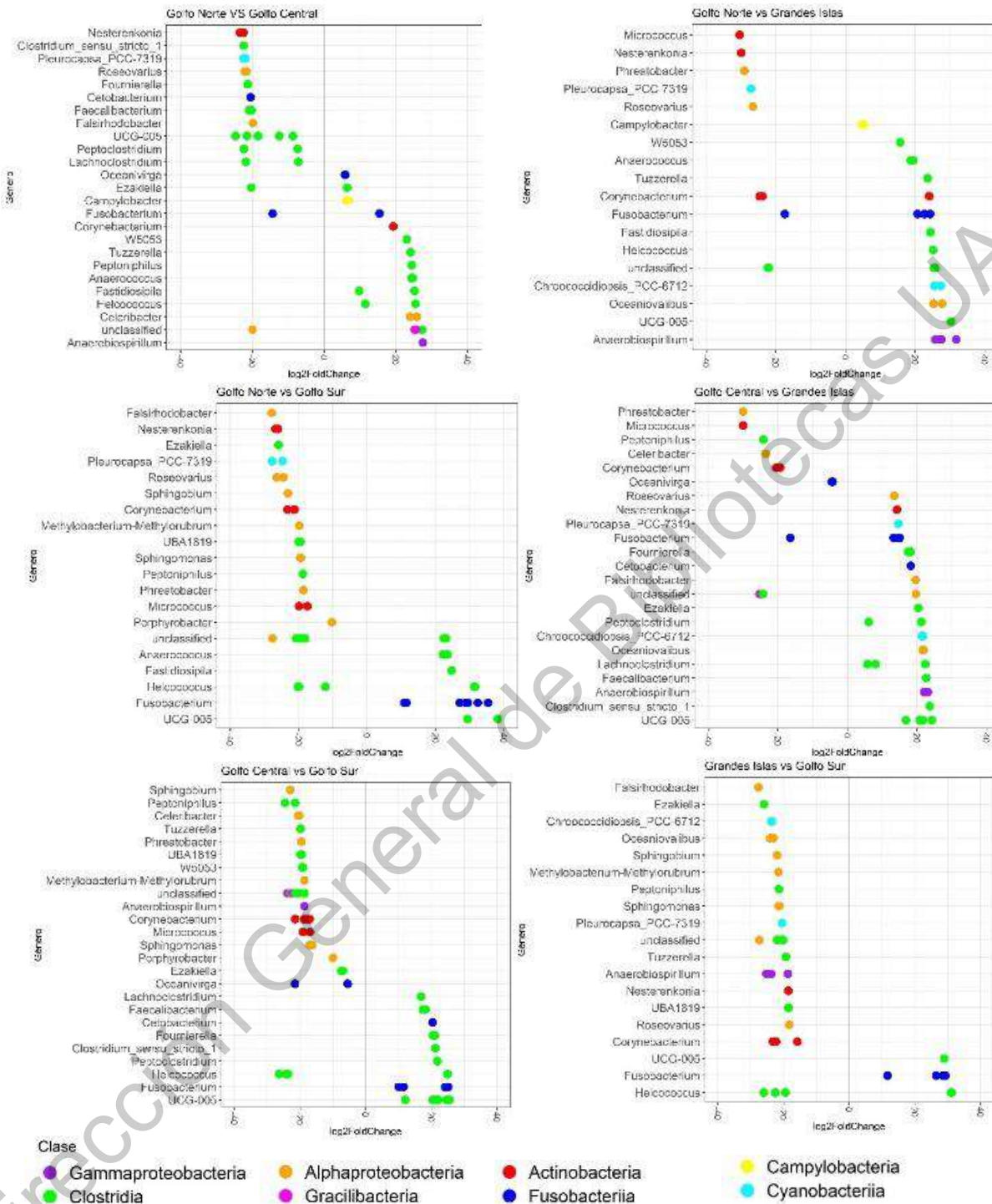


Figura 9. Abundancia diferencial en muestras de epitelio genital de hembras adultas de *Zalophus californianus*, agrupadas por región ecológica

California con base en marcadores ecológicos, ambientales y de salud, como la tendencia poblacional de las colonias, la temperatura superficial media del mar, la concentración de clorofila α , concentración de metales pesados en tejidos de los

lobos marinos, los serotipos de anticuerpos contra *Leptospira interrogans*, su señal isotópica y osteopatías (Szteren y Auriolles Gamboa, 2011). Un estudio reciente encontró evidencia de esa regionalización con base en los perfiles transcripcionales de la actividad inmune (Peñin et al., 2019), y los autores sugirieron que estos patrones podrían reflejar diferencias en la exposición a patógenos, entre otras cosas. Los resultados aquí obtenidos muestran que la composición del microbioma también refleja diferencias ecológicas interregionales. En el humano se conoce la influencia del ambiente en la configuración del microbioma intestinal (Tamburini et al., 2016). La localización geográfica tiene influencia sobre el microbioma de la piel de mamíferos terrestres y marinos. Por ejemplo, delfines nariz de botella de hábitos pelágicos tienen un microbioma más diverso que los costeros (Ross et al., 2019). También influyen los hábitos durante el desarrollo. Por ejemplo, el microbioma vaginal prepuberal es resultado de colonización desde la piel y el intestino (Alarcón et al., 2016; Álvarez-Calatayud et al., 2015; Torcia, 2019); luego con la pubertad se dan las condiciones para que *Lactobacillus* se convierta en el género dominante (Witkin y Linhares, 2017). En el caso del lobo marino de California no se da esta dominancia de *Lactobacillus*, por lo que es posible que el microbioma de las hembras adultas siga teniendo una influencia importante de bacterias cutáneas e intestinales, que a su vez tendrían cierta influencia ambiental. Esto también explicaría la presencia de bacterias asociadas al tracto gastrointestinal (*Faecalimonas*) y a la piel (*Cutibacterium*) en otros mamíferos (Sakamoto et al., 2017; Ugge et al., 2018).

Cuadro 4. ASVs más abundantes en las distintas regiones ecológicas							
ASVs más abundantes en el Golfo Norte							
ASV	Género	Comparado con Golfo Central		Comparado con Grandes Islas		Comparado con Golfo Sur	
		Log2 fold change	P	Log2 fold change	P	Log2 fold change	P
ASV338	<i>Nesterekonia</i>	23.475	6.9e-10	29.940	2.4e-14	26.029	8.0e-6
ASV438	<i>Pleurocapsa</i>	22.481	3.5e-9	27.117	4.9e-12	24.728	2.2e-5
ASV334	<i>Roseovarius</i>	22.115	6.2e-9	26.611	1.2e-11	24.429	2.7e-5
ASVs más abundantes en las Grandes Islas							
ASV	Género	Comparado con Golfo Norte		Comparado con Golfo Central		Comparado con Golfo Sur	
		Log2 fold change	P	Log2 fold change	P	Log2 fold change	P
ASV393	<i>Anaerobiospirillum</i>	31.785	7.1e-16	23.133	2.4e-10	25.245	1.1e-5
ASV442	<i>Anaerobiospirillum</i>	27.490	3.0e-12	23.068	2.7e-10	25.092	1.2e-5
ASV485	<i>Anaerobiospirillum</i>	27.025	6.9e-12	22.500	7.4e-10	24.299	2.3e-5
ASV613	<i>Anaerobiospirillum</i>	25.767	6.2e-12	21.986	1.8e-9	23.721	3.5e-5
ASV260	<i>Chroococcidiopsis</i>	25.584	8.5e-11	21.733	2.8e-9	23.529	4.1e-5
ASV249	<i>Chroococcidiopsis</i>	27.312	4.2e-12	21.438	4.5e-9	23.700	3.6e-5
ASV484	<i>Oceaniovalibus</i>	27.705	2.1e-12	21.922	2.0e-9	24.075	2.7e-5
ASV560	<i>Oceaniovalibus</i>	25.257	1.5e-10	21.630	3.3e-9	23.034	5.9e-5
ASVs más abundantes en el Golfo Central							
ASV	Género	Comparado con Golfo Norte		Comparado con Grandes Islas		Comparado con Golfo Sur	
		Log2 fold change	P	Log2 fold change	P	Log2 fold change	P
ASV4	<i>Oceanivirga</i>	5.953	1.9e-5	4.256	0.0014	5.486	0.0071
ASV175	<i>Peptoniphilus</i>	24.444	1.7e-10	24.195	4.0e-11	21.484	0.0001
ASV265	<i>Celeribacter</i>	24.025	3.5e-10	23.433	1.6e-10	20.608	0.0002
ASV279	<i>Celeribacter</i>	25.868	1.4e-11	23.634	1.1e-10	20.273	0.0003
ASVs más abundantes en el Golfo Sur							
ASV	Género	Comparado con Golfo Norte		Comparado con Golfo Central		Comparado con Grandes islas	
		Log2 fold change	P	Log2 fold change	P	Log2 fold change	P
ASV391	<i>Ruminococcaceae UCG005</i>	29.370	2.7e-7	25.478	3.9e-6	28.878	2.5e-7
ASV665	<i>Fusobacterium</i>	29.421	2.6e-7	24.900	6.4e-6	29.262	1.8e-7
ASV473	<i>Fusobacterium</i>	28.845	4.4e-7	25.094	5.4e-6	28.527	3.5e-07

Cuadro 5. ASVs más abundantes en dos regiones ecológicas						
ASVs más abundantes en Golfo Norte y Grandes Islas						
ASV	Género	Región	Comparado con Golfo Central		Comparado con Golfo Sur	
			Log2 fold change	P	Log2 fold change	P
ASV506	<i>Falsirhodobacter</i>	Golfo Norte	19.828	1.9e-7	27.864	1.8e-6
ASV506	<i>Falsirhodobacter</i>	Grandes Islas	19.598	8.6e-8	27.633	1.5e-6
ASVs más abundantes en Golfo Norte y Golfo Central						
ASV	Género	Región	Comparado con Grandes Islas		Comparado con Golfo Sur	
			Log2 fold change	P	Log2 fold change	P
ASV293	<i>Phreatobacter</i>	Golfo Norte	29.031	5.7e-15	18.603	0.0008
ASV286	<i>Micrococcus</i>	Golfo Norte	30.391	1.0e-14	17.433	0.0028
ASV293	<i>Phreatobacter</i>	Golfo Central	30.000	5.3e-18	19.572	0.0003
ASV286	<i>Micrococcus</i>	Golfo Central	30.000	2.8e-16	17.041	0.0026
ASVs más abundantes en Golfo Central y Grandes Islas						
ASV	Género	Región	Comparado con Golfo Norte		Comparado con Golfo Sur	
			Log2 fold change	P	Log2 fold change	P
ASV187	<i>Tuzzerella</i>	Golfo Central	24.117	6.8e-12	19.853	0.0001
ASV187	<i>Tuzzerella</i>	Grandes Islas	23.536	7.6e-11	19.272	0.0003

Cuadro 6. ASVs menos abundantes en las distintas regiones ecológicas							
ASVs menos abundantes en el Golfo Norte							
ASV	Género	Comparado con Golfo Central		Comparado con Grandes Islas		Comparado con Golfo Sur	
		Log2 fold change	P	Log2 fold change	P	Log2 fold change	P
ASV308	<i>Anaerococcus</i>	-24.739	1.0e-10	-18.714	2.5e-6	-23.481	4.0e-5
ASV354	<i>Anaerococcus</i>	-24.412	1.8e-10	-19.408	9.8e-7	-23.000	0.0001
ASV218	<i>Fastidiosipila</i>	-25.241	1.5e-16	-24.422	7.6e-15	-24.668	5.0e-8
ASVs menos abundantes en el Golfo Central							
ASV	Género	Comparado con Golfo Norte		Comparado con Grandes Islas		Comparado con Golfo Sur	
		Log2 fold change	P	Log2 fold change	P	Log2 fold change	P
ASV173	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	-22.408	3.9e-9	-23.683	8.9e-11	-21.219	0.0001
ASV302	<i>Fournierella</i>	-21.267	2.3e-8	-18.202	6.9e-7	-20.987	0.0001
ASV310	<i>Fournierella</i>	-21.351	2.0e-8	-17.394	2.3e-6	-20.489	0.0002
ASV219	<i>Peptoclostridium</i>	-22.364	4.3e-15	-21.211	1.0e-14	-21.782	1.1e-7
ASV251	<i>Lachnoclostridium</i>	-21.842	1.2e-12	-22.378	3.5e-14	-16.827	0.0002
ASVs menos abundantes en el Golfo Sur							
ASV	Género	Comparado con Golfo Norte		Comparado con Golfo Central		Comparado con Grandes islas	
		Log2 fold change	P	Log2 fold change	P	Log2 fold change	P
ASV77	<i>Sphingobium</i>	-23.124	9.8e-8	-22.979	5.0e-8	-21.952	2.8e-7
ASV165	<i>Methylobacterium</i>	-19.853	2.3e-5	-18.658	4.3e-5	-21.562	3.0e-6
ASV248	<i>Ruminococcaceae_UBA1819</i>	-19.969	0.0006	-19.815	0.0004	-18.504	0.0013
ASV261	<i>Ruminococcaceae_UBA1819</i>	-19.517	0.0008	-19.497	0.0005	-18.555	0.0012
ASV205	<i>Sphingomonas</i>	-19.516	0.0008	-17.098	0.0025	-21.533	0.0002
ASV228	<i>Sphingomonas</i>	-19.344	0.0009	-16.277	0.0047	-21.266	0.0002

Objetivo 3. Determinar las diferencias en abundancia y ensamblaje del microbioma cervical de lobos marinos de California con epitelio sano y con transformación pre-oncogénica

Con base en los espectros de diversidad de Rényi se determinó que los índices de diversidad alfa no variaron entre estados patológicos (Fig. 10). Algo semejante se observó con la diversidad beta (Fig. 11), ya que el PERMANOVA tampoco permitió encontrar diferencias entre estados patológicos ($F = 1.02612$, $R^2 = 0.16394$, $P = 0.4109$).

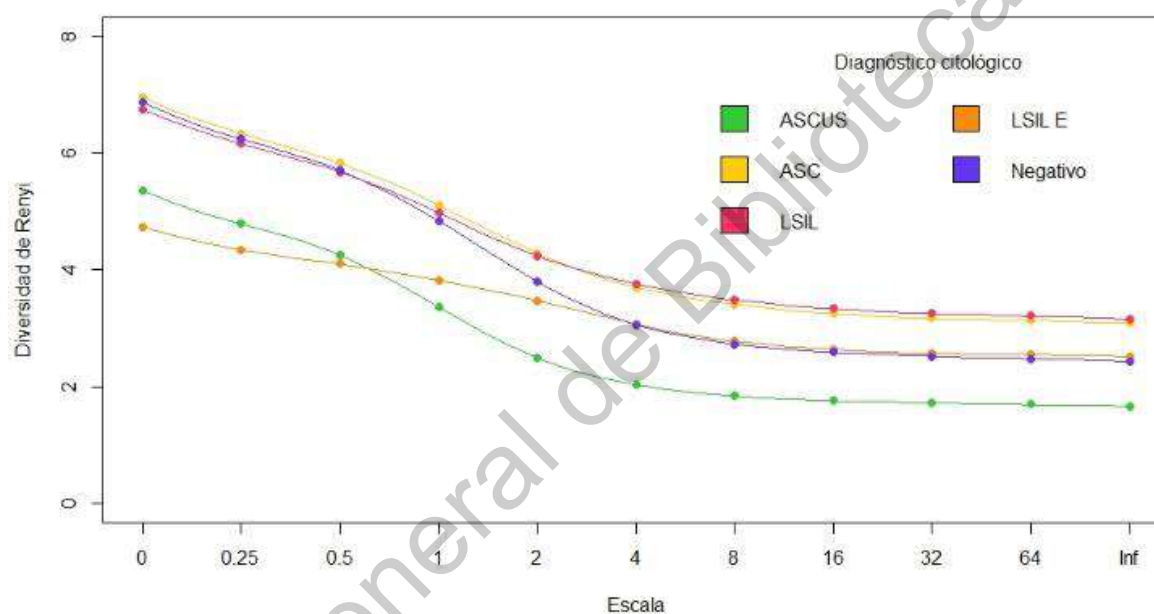


Figura 10. Espectros de entropía de Rényi agrupados por diagnóstico citológico, de acuerdo con el sistema de clasificación Bethesda para citologías vaginales (ver Barragán-Vargas, 2015; Nayar y Wilbur, 2015).

Diversos estudios han encontrado una relación entre la diversidad de la microbiota y el estado de salud del individuo, donde la pérdida de diversidad se ha asociado a diversas patologías en humanos. Por ejemplo, la pérdida de diversidad en el microbioma oral coincide con el progreso de caries (Gross et al., 2010), y la pérdida de diversidad en el microbioma intestinal está asociada a cáncer colorrectal, obesidad, diabetes *mellitus* tipo 2, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad celíaca y autismo, entre otras enfermedades (Mosca et al., 2016). Además, individuos con baja diversidad bacteriana poseen un fenotipo

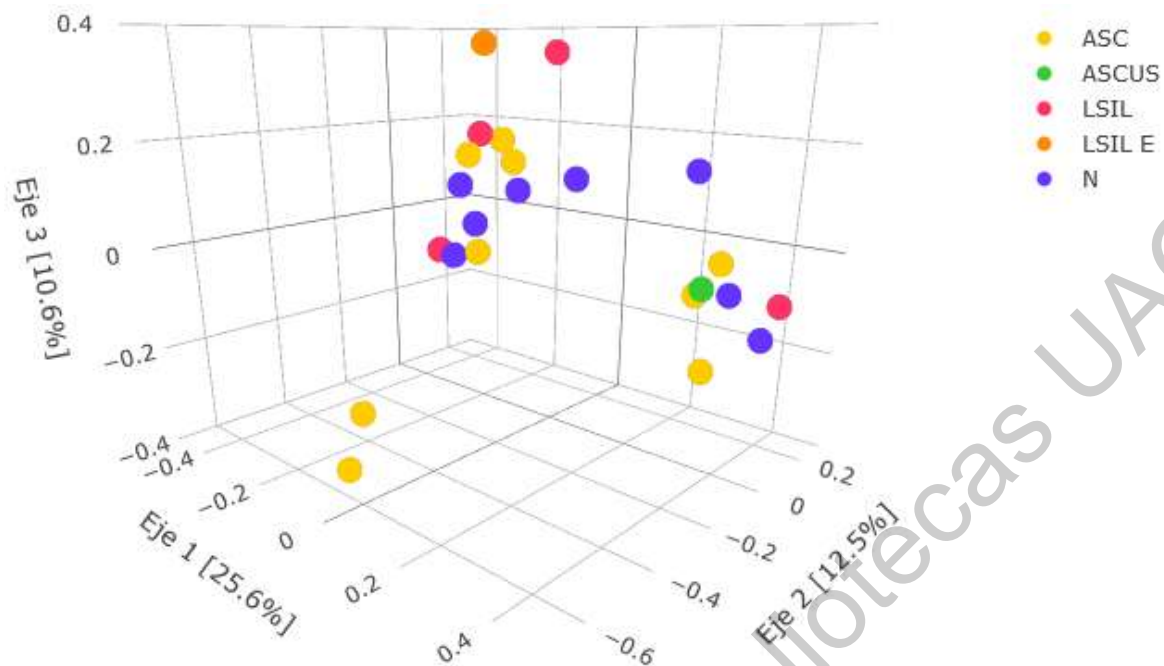


Figura 11. Análisis de PCoA de las muestras de epitelio genital de hembras adultas de *Zalophus californianus*, agrupadas por diagnóstico citológico.

pronunciadamente más inflamatorio (Le Chatelier et al., 2013). Incluso, una baja diversidad microbiana intestinal puede afectar los niveles de metabolitos antiproliferativos y conducir al inicio o la progresión del cáncer mamario (Eslami et al., 2020). Incluso parece influir en el pronóstico de enfermedades crónicas. Por ejemplo, el microbioma tumoral de pacientes de cáncer pancreático que sobrevivieron más de cinco años es más diverso en comparación con el de los que sobrevivieron menos tiempo (Riquelme et al., 2019). Sin embargo, no parece universal la relación. Al igual que en la presente tesis, en un estudio del microbioma del epitelio genital de mujeres (Laniewsky et al., 2018) no se observaron diferencias en la diversidad bacteriana entre mujeres con cáncer cervical de acuerdo con la severidad de la patología, mientras que lo que en dicho estudio determinaba las diferencias era el pH vaginal, aunque una mayor diversidad de la microbiota aumenta el riesgo de adquisición de enfermedades de transmisión sexual (Lewis et al., 2017).

A pesar de la falta de evidencia de diferencias en la diversidad, sí se observaron asociaciones entre la clasificación citológica del epitelio y la abundancia

de las ASVs. En particular, las ASVs clasificados en los géneros *Campylobacter*, *Oceanivirga*, *Parvimonas*, *Peptoniphilus* y *Peptostreptococcaceae W5053* (que tuvo un porcentaje de identidad de 92.12% con una secuencia de *Peptoniphilus metionivorax*, *Query cover* = 100%, *E-value* = 7e-169), además de algunos ASV's sin clasificar a nivel de género, de la clase *Clostridia*, varió entre las muestras negativas a displasia celular y con diagnóstico de ASC (Fig. 12a y Cuadro 7).

Haber encontrado una mayor abundancia del género *Campylobacter* en muestras clasificadas como ASC fue interesante, ya que la toxina distensora citoletal (CDT) de *Campylobacter jejuni* se ha asociado con el desarrollo de cáncer colorrectal (He et al., 2019). Al indagar mediante BLAST cuál era la especie de los ASV's clasificados como *Campylobacter*, la mayor similitud se encontró con *C. gracilis*, con un porcentaje de identidad de 94.54% para el ASV5 y 94.30% para el ASV10 (En BLAST, ambos con *E-value* de 0 y *query coverage* de 100%). Para esta

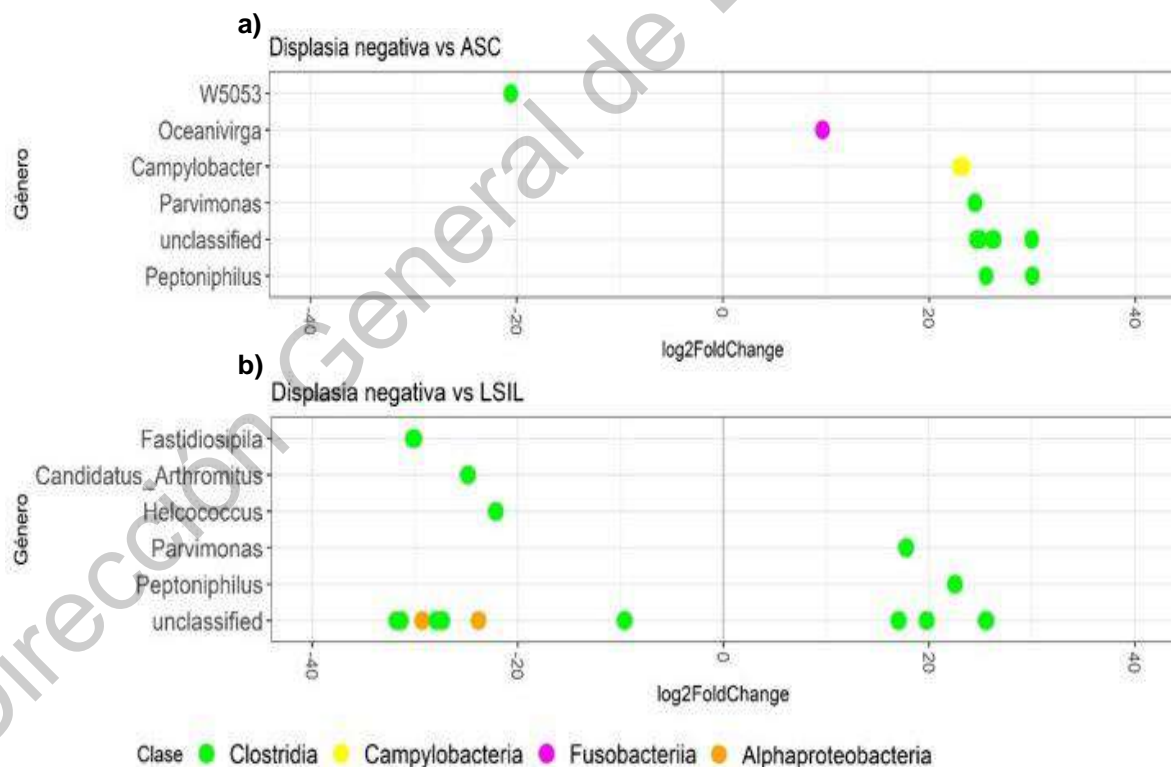


Figura 12. Abundancia diferencial por diagnóstico citológico, de acuerdo al sistema Bethesda para diagnóstico citológico (Nayar y Wilbur, 2015). a) Comparativa entre muestras negativas a displasia celular y con ASC, los valores positivos indican mayor abundancia en muestras con ASC, y los negativos, mayor abundancia en muestras negativas a displasia celular. b) Comparativa entre muestras negativas a displasia celular y con LSIL.

especie bacteriana no se ha reportado ningún gen similar al de la CDT, aunque se ha documentado su papel como patógeno oportunista, principalmente en la cavidad oral y pulmones (Iraola et al., 2014; Shinha, 2015; He et al., 2019). Por otro lado, otro de los géneros detectados con mayor abundancia en muestras cervicales con ASC, *Oceanivirga*, fue determinado como parte del microbioma núcleo. Esta especie ha sido reportada en salmones con lesiones necróticas multifocales (Eisenberg et al., 2016), y es filogenéticamente cercana a *Sneathia sanguinegens*, la cual se ha reportado en abundancia en mujeres con lesiones cervicales precancerosas (Laniewsky et al., 2018), por lo que es posible que bajo ciertas condiciones esta bacteria cambie de ser comensal a patógena, y aumente su virulencia, afectando el epitelio genital del lobo marino de California.

Parvimonas, otro género detectado en mayor abundancia en las muestras cervicales de hembras adultas con ASC, forma parte de la microbiota comensal del tracto gastrointestinal del humano (Khan et al., 2019), aunque se ha reportado como patógeno oportunista en algunos casos de cáncer, específicamente de cáncer colorrectal (Murphy y Frick, 2013; García et al., 2016; Khan et al., 2019; Kim et al.,

Cuadro 7. Abundancia diferencial entre muestras negativas a displasia celular y con ASC				
ASV	Clase	Género	Log2 fold change	p
ASV13	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	9.651	0.0013
ASV132	<i>Clostridia</i>	<i>Parvimonas</i>	24.435	1.2e-12
ASV134	<i>Clostridia</i>	<i>Parvimonas</i>	24.429	1.2e-12
ASV138	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	24.568	9.1e-13
ASV139	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	26.285	2.1e-14
ASV148	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>	23.264	1.3e-11
ASV167	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>	22.951	2.5e-11
ASV175	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>	30.000	2.7e-18
ASV188	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>	25.506	1.2e-13
ASV206	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	26.104	3.2e-14
ASV264	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	29.937	3.2e-18
ASV277	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	24.924	4.3e-13
ASV403	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcaceae W5053</i>	-20.574	2.1e-09
Nota: Un valor de Log2 fold change positivo indica que ese ASV es más abundante en muestras con ASC, y un valor negativo indica que ese ASV es menos abundante en dicha condición, y por lo tanto más abundante en muestras negativas a displasia celular.				

2020). Se ha reportado en *Parvimonas* actividad de ADNasa extracelular, cuya principal función es la de evadir el sistema inmune y favorecer su diseminación, aunque dicha actividad podría llegar a alterar el ADN de las células cercanas, favoreciendo la aparición de mutaciones que lleven al desarrollo de neoplasias (Palmer et al., 2012). Estudios futuros podrían enfocarse en determinar si hay evidencia de factores de virulencia en las especies de *Parvimonas* del epitelio genital del lobo marino de California para comprender la relevancia biológica de su presencia en el epitelio cervical pre-transformado de esta especie.

Finalmente, varias especies de *Peptoniphilus*, género detectado en mayor abundancia en las muestras de epitelios cervicales con ASC, se han reportado en la sangre con septicemia y una variedad de condiciones concomitantes, incluyendo cáncer de colon, vejiga urinaria y próstata en humanos (Brown et al., 2014). Sin embargo, también ha sido reportado como parte del microbioma vaginal de cuyos y de macacos, sin que se reportaran anomalías citológicas en ellos (Neuendorf et al., 2015; Nugeyre et al., 2019), lo que implica que es posible que, al igual que lo aquí discutido para otras bacterias, la virulencia de *Peptoniphilus* dependa de diversos factores, incluyendo la historia coevolutiva con el hospedero desde el origen de su relación.

Las secuencias de los ASVs que no alcanzaron clasificación hasta género y que se detectaron en mayor abundancia en las muestras de epitelio cervical con ASC fueron investigadas mediante BLAST (Zhang et al., 2000), encontrándose similitud con *Christensenella minuta*, *Eubacterium rumiantium* y *Negativibacillus massiliensis* (Cuadro 8). Este hallazgo fue inesperado, ya que la presencia de la familia *Christensenellaceae* en el microbioma se ha asociado a estados de salud en el humano y otros animales, aunque existe un reporte de bacteremia por *Christensenella minuta* en humanos (López et al., 2017; Waters y Ley, 2019), lo que implica que existe la posibilidad de que este organismo se comporte como un patógeno facultativo, al menos en la especie de estudio. Por otro lado, *Eubacterium rumiantium* es una bacteria que habita el rumen de bovinos domésticos, con la

capacidad de metabolizar celulosa, y *Negativibacillus massiliensis* ha sido aislada del colon de seres humanos (Kobayashi *et al.*, 1998; Ricaboni *et al.*, 2016). Es posible que en el lobo marino también se encuentren presentes en el tracto digestivo, y de ahí colonizan el epitelio cervical por la cercanía anatómica entre el ano y la entrada de la vagina, y que en presencia de alteraciones epiteliales estas puedan permanecer por más tiempo.

Cuadro 8. ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras negativas a displasia celular y con ASC

ASV	Clase	Especie	Query coverage	e-value	Porcentaje de identidad
ASV138	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium rumiantium</i>	100.00%	0	94.06%
ASV277	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	8e-124	85.71%
ASV206	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus massiliensis</i>	100.00%	3e-177	93.16%
ASV139	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium rumiantium</i>	100.00%	0	93.82%
ASV264	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	4e-122	85.48%

Se observaron algunas similitudes en la abundancia diferencial de ASVs bacterianos en las muestras cervicales con LSIL y las observadas para ASC (Fig. 12b). Específicamente, *Parvimonas* y *Peptoniphilus* se encontraron en mayor abundancia en los tejidos con LSIL (Cuadro 9), así como algunos ASVs sin clasificación a nivel de género pertenecientes a las clases *Clostridia* y *Alphaproteobacteria*, como *Negativibacillus*, *Eubacterium rumiantium* y *Christensenella*, lo que sugiere que estas bacterias se aprovechan de las alteraciones en el microambiente epitelial provocadas por la displasia para proliferar, aunque no parecen tener algún factor de patogenicidad o virulencia. Sin embargo, otros géneros estuvieron presentes en menor abundancia en los epitelios con LSIL, como *Fastidiosipila*, *Candidatus arthromitus* y *Helcococcus*. *Fastidiosipila* forma parte del microbioma vaginal de perras, ovejas y cabras (Swatz *et al.*, 2014; Lyman *et al.*, 2019), lo que sugiere que su presencia es común en diferentes linajes filogenéticos. Es posible que los cambios inducidos por la infección por ZcPV-1 inhiban su proliferación, ya que no se observaron diferencias en su abundancia entre muestras de epitelio sano y muestras con ASC. Es importante remarcar que ASC es una condición que engloba cambios no

relacionados a la infección por *Papillomavirus*, a diferencia de LSIL, que abarca las anomalías citológicas relacionadas con la infección por estos virus (Nayar y Wilbur, 2015).

Candidatus arthromitus forma parte de las bacterias segmentadas filamentosas, las cuales participan en la maduración de linfocitos Th17 y respuestas de Ig-A's en el intestino de varias especies, ayudando a modular la respuesta inmune contra patógenos (Hedblom et al., 2018), y ya había sido detectada con anterioridad en el epitelio rectal de lobos marinos de California y delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) (Bik et al., 2016). Si bien no existen reportes sobre una función específica de esta bacteria en el epitelio vaginal, es interesante haberlo detectado en menor cantidad en el epitelio de hembras adultas con LSIL. Otra de las bacterias que se detectó en menor abundancia en los epitelios con LSIL fue *Helcococcus*, que también formó parte del microbioma

ASV	Clase	Género	Log2 fold change	p
ASV108	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-31.823	2.8e-13
ASV118	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-31.399	5.8e-13
ASV128	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-27.358	3.5e-10
ASV134	<i>Clostridia</i>	<i>Parvimonas</i>	17.759	4.7e-05
ASV137	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-27.938	1.5e-10
ASV138	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	17.014	1.0e-04
ASV175	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>	22.499	2.6e-07
ASV183	<i>Clostridia</i>	<i>Candidatus arthromitus</i>	-24.884	1.1e-08
ASV202	<i>Clostridia</i>	<i>Fastidiosipila</i>	-30.205	2.2e-19
ASV206	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	25.570	2.7e-09
ASV218	<i>Clostridia</i>	<i>Fastidiosipila</i>	-30.080	4.3e-15
ASV222	<i>Alphaproteobacteria</i>	Sin clasificar	-23.837	4.5e-08
ASV223	<i>Alphaproteobacteria</i>	Sin clasificar	-29.310	1.8e-11
ASV264	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	25.486	4.6e-09
ASV277	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	19.754	6.0e-06
ASV47	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-9.635	5.3e-04
ASV90	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>	-22.162	3.6e-07

Nota: Un valor de Log2 fold change positivo indica que ese ASV es más abundante en muestras con LSIL, y un valor negativo indica que ese ASV es menos abundante en dicha condición, y por lo tanto más abundante en muestras negativas a displasia celular.

núcleo. Este género bacteriano se ha asociado a patologías del tracto urinario en humanos y ovejas (Chow y Clarridge, 2014). Es posible que en el lobo marino de California su función metabólica y competencia con otros microorganismos contribuya a mantener el epitelio vaginal sano, y que su baja abundancia pudiera servir como indicador de buena salud epitelial, como sucede con *Faecalibacterium prausnitzii* y el cáncer colorrectal en seres humanos (Ferreida-Halder et al., 2017), aunque esto necesitaría comprobarse con un mayor número de muestras.

Los ASVs sin clasificar que se observaron en menor abundancia en epitelios con LSIL, fueron identificadas como *Eubacterium coprostanoligenes*, *Tiserella creatinophila*, *Ruminiclostridium cellobioparum* y *Yoonia maritima* (Cuadro 10). *Yoonia maritima* se ha encontrado en sedimentos poco profundos en el Mar de Japón (Tanaka et al., 2014; Wirth y Whitman, 2018). *Eubacterium coprostanoligenes* y *T. creatinophila* han sido encontradas en aguas residuales (Harms et al., 1998), aunque la primera también ha sido reportada en el intestino humano (Gérard, 2013), y Kim et al. (2020) encontraron mayor abundancia de esta especie en pacientes con cáncer colorrectal. Eso contrasta con lo observado aquí, ya que su abundancia fue menor en los epitelios que presentaban lesiones precancerosas. *Ruminiclostridium cellobioparum* se ha encontrado en el tracto digestivo de rumiantes (Seshadri et al., 2018), y su presencia en las muestras de epitelio cervical del lobo marino de California podría deberse a una colonización desde el intestino, ya que, como se comentó antes, esta es la vía de entrada de algunas bacterias simbióticas durante etapas tempranas de la vida, al menos en el humano (Alarcón et al., 2016; Álvarez-Calatayud et al., 2015; Torcia, 2019). Se desconoce cuál sea su relevancia en el epitelio genital del lobo marino de California, aunque su menor abundancia en los epitelios con LSIL podría indicar que tiene un papel en el mantenimiento del epitelio sano.

Además de las diferencias en la abundancia de ciertos grupos bacterianos observados entre los epitelios sanos y los que presentaban ASC/LSIL, se

Cuadro 10. ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras sin displasia celular y muestras con LSIL

ASV	Clase	Especie	Query coverage	e-value	Porcentaje de identidad
ASV47	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	100.00%	0	96.22%
ASV138	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium rumiantium</i>	100.00%	0	94.06%
ASV277	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	8e-124	85.71%
ASV222	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Yoonia maritima</i>	100.00%	0	97.38%
ASV264	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	4e-122	85.48%
ASV206	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus massiliensis</i>	100.00%	3e-177	93.16%
ASV128	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminiclostridium cellobioparum</i>	100.00%	3e-123	85.65%
ASV137	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminiclostridium cellobioparum</i>	100.00%	1e-121	85.41%
ASV223	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Yoonia maritima</i>	100.00%	0	97.14%
ASV118	<i>Clostridia</i>	<i>Tissierella creatinophila</i>	100.00%	7e-15	90.69%
ASV108	<i>Clostridia</i>	<i>Tissierella creatinophila</i>	100.00%	2e-160	90.93%

encontraron diferencias entre el epitelio sano y los que presentaban ASCUS y LSIL E (Fig. 13 y Cuadros 11 y 12); sin embargo, ya que el número de individuos con estas alteraciones fue muy baja, no fue posible analizar estadísticamente las diferencias, ni examinar la potencial relevancia biológica de dichas asociaciones.

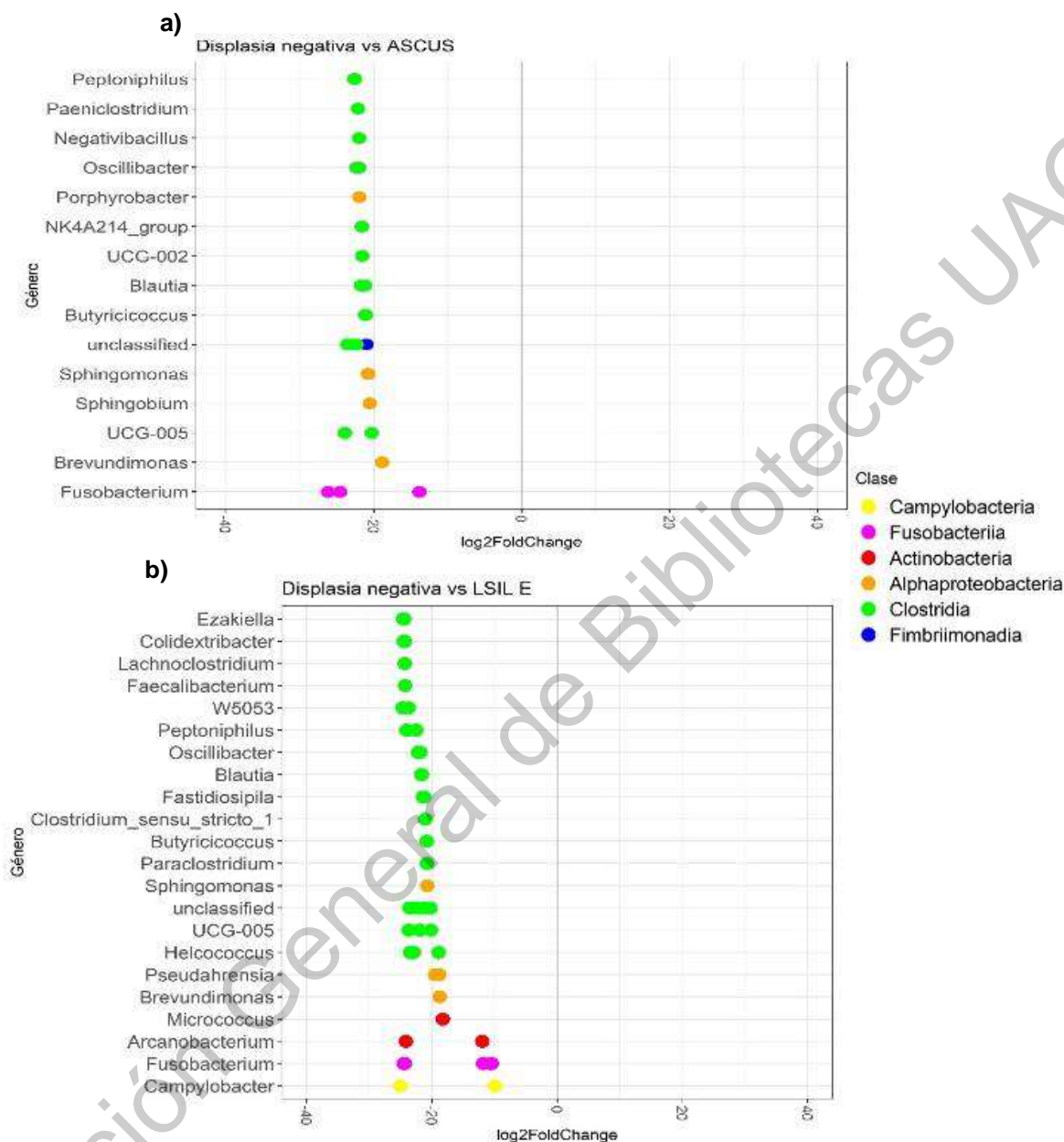


Figura 13. Abundancia diferencial por diagnóstico citológico, comparando entre muestras negativas a lesión intraepitelial y con ASCUS o LSIL E. a) Comparativa entre muestras negativas a displasia celular y con ASCUS. Los valores positivos indican mayor abundancia en muestras con ASCUS, y los negativos, mayor abundancia en muestras negativas a displasia celular. b) Comparativa entre muestras negativas a displasia celular y con LSIL E

Cuadro 11. Abundancia diferencial entre muestras sin displasia celular y con ASCUS				
ASV	Clase	Género	Log2 fold change	P
ASV7	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	-26.150	2.8e-12
ASV9	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	-13.794	0.0002
ASV44	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>	-21.965	8.5e-05
ASV49	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Porphyrobacter</i>	-21.914	0.0001
ASV50	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	-24.551	2.9e-08
ASV51	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	-23.885	2.1e-06
ASV54	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214</i>	-21.580	4.7e-05
ASV83	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>	-22.619	1.8e-05
ASV92	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>	-22.520	4.6e-05
ASV95	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillibacter</i>	-21.960	8.8e-05
ASV97	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	-21.162	1.7e-05
ASV98	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillibacter</i>	-22.297	0.0002
ASV100	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	-21.692	0.0001
ASV103	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	-21.309	3.6e-06
ASV107	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-002</i>	-21.522	0.0001
ASV108	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-23.156	0.0024
ASV111	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>	-20.721	7.7e-05
ASV115	<i>Clostridia</i>	<i>Butyricoccus</i>	-21.053	2.0e-05
ASV118	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-22.314	0.0033
ASV119	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>	-20.782	0.0002
ASV120	<i>Clostridia</i>	<i>Butyricoccus</i>	-21.140	3.3e-05
ASV124	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-23.337	0.0022
ASV126	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-23.568	0.0020
ASV130	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingobium</i>	-20.528	0.0004
ASV133	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	-20.254	0.0015
ASV221	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>	-18.824	0.0030
ASV238	<i>Fimbriimonadia</i>	Sin clasificar	-20.950	0.0020
ASV253	<i>Clostridia</i>	<i>Paeniclostridium</i>	-22.115	0.0017

Nota: Un valor de Log2 fold change positivo indica que ese ASV es más abundante en muestras con ASCUS, y un valor negativo indica que ese ASV es menos abundante en dicha condición, y por lo tanto más abundante en muestras negativas a displasia celular.

Cuadro 12. Abundancia diferencial entre muestras sin displasia celular y con LSIL E				
ASV	Clase	Género	Log2 fold change	P
ASV1	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	-10.631	9.8e-05
ASV2	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	-11.830	3.7e-05
ASV5	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>	-25.048	7.4e-11
ASV10	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>	-9.940	0.0038
ASV12	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>	-24.618	1.9e-08
ASV21	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	-24.513	6.6e-08
ASV23	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	-24.529	6.6e-08
ASV24	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>	-11.968	0.0037
ASV25	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>	-24.173	4.1e-09
ASV28	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>	-24.357	2.3e-07
ASV33	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>	-24.293	8.2e-07
ASV34	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-23.577	1.6e-06
ASV36	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>	-23.400	2.7e-08
ASV38	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>	-23.995	6.7e-07
ASV40	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>	-23.513	4.5e-08
ASV41	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>	-24.063	3.3e-07
ASV42	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>	-24.526	8.3e-07
ASV43	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	-21.941	7.3e-06
ASV45	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>	-24.362	4.7e-06
ASV46	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	-21.880	3.5e-06
ASV48	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-23.012	7.3e-06
ASV50	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	-24.323	3.9e-08
ASV51	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	-23.677	2.6e-06
ASV58	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	-23.738	5.1e-07
ASV62	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>	-23.026	2.1e-06
ASV70	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>	-22.918	1.1e-05
ASV72	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	-10.529	0.0040
ASV75	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcaceae W5053</i>	-23.724	5.6e-06
ASV79	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	-10.460	0.0044
ASV83	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>	-22.563	1.9e-05
ASV85	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>	-18.945	0.0012
ASV92	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>	-22.493	4.8e-05
ASV94	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	-21.706	8.6e-05
ASV95	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillibacter</i>	-21.853	9.5e-05
ASV98	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillibacter</i>	-22.198	0.0003

Nota: Un valor de Log2 fold change positivo indica que ese ASV es más abundante en muestras con LSIL E, y un valor negativo indica que ese ASV es menos abundante en dicha condición, y por lo tanto más abundante en muestras negativas a displasia celular

Cuadro 12. Abundancia diferencial entre muestras negativas a displasia celular y con LSIL E (Continuación)

ASV	Clase	Género	Log2 fold change	P
ASV100	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	-21.604	0.0002
ASV105	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-20.230	0.0019
ASV108	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-22.880	0.0027
ASV111	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>	-24.421	9.6e-09
ASV110	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-20.659	0.0037
ASV118	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-22.239	0.0035
ASV119	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>	-20.741	0.0002
ASV120	<i>Clostridia</i>	<i>Butyricoccus</i>	-20.837	4.3e-05
ASV124	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-23.301	0.0022
ASV126	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-23.500	0.0020
ASV128	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-21.099	0.0056
ASV133	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	-20.155	0.0015
ASV135	<i>Clostridia</i>	<i>Paraclostridium</i>	-20.794	0.0056
ASV136	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-21.132	0.0055
ASV137	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	-21.426	0.0049
ASV140	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pseudahrensia</i>	-19.519	0.0002
ASV144	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pseudahrensia</i>	-18.836	0.0005
ASV158	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcus</i>	-18.265	0.0060
ASV173	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	-21.053	0.0057
ASV202	<i>Clostridia</i>	<i>Fastidiosipila</i>	-21.456	0.0003
ASV218	<i>Clostridia</i>	<i>Fastidiosipila</i>	-21.283	0.0015
ASV221	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>	-18.768	0.0031
ASV238	<i>Fimbriimonadia</i>	Sin clasificar	-20.878	0.0021
ASV403	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcaceae W5053</i>	-24.709	0.0012

Nota: Un valor de Log2 fold change positivo indica que ese ASV es más abundante en muestras con LSIL E, y un valor negativo indica que ese ASV es menos abundante en dicha condición, y por lo tanto más abundante en muestras negativas a displasia celular

Microbioma en estados de inflamación epitelial

Los espectros de diversidad de Rényi indican que la diversidad alfa es ligeramente mayor en muestras de epitelio con inflamación en comparación con aquellas sin inflamación (Fig. 14). Esto contrasta con lo reportado por otros estudios que encontraron que a una menor diversidad alfa, ocurren más trastornos inflamatorios, como la mastitis (Eslami et al., 2020), enfermedades inflamatorias intestinales (Mosca et al., 2016) y, en general, un fenotipo marcadamente más inflamatorio (Le Chatelier et al., 2013). La Fig. 15 muestra el análisis de PCoA; las diferencias en diversidad beta no fueron estadísticamente significativas entre estados de inflamación, de acuerdo al PERMANOVA ($F = 0.78217$, $R^2 = 0.06248$, $p = 0.7943$)

Se observaron diferencias en la abundancia de bacterias entre animales sin inflamación epitelial cervical y aquellos con algún grado de inflamación (Fig. 16 y Cuadros 13 y 14). En la comparativa entre muestras de animales sin inflamación y con inflamación moderada (Fig. 16a y Cuadro 13) sobresale la cantidad de ASVs pertenecientes a las clases *Fusobacteriia* y *Clostridia* que están expresados diferencialmente, además de algunos de las clases *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Gracilibacteria*.

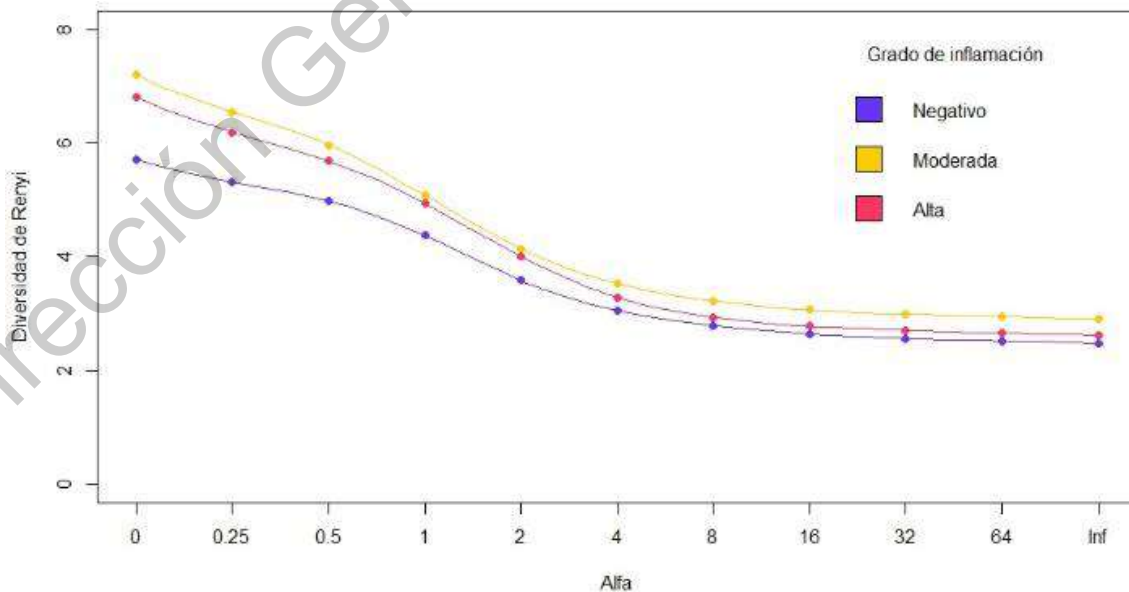


Figura 14. Espectros de entropía de Rényi agrupados por grado de inflamación

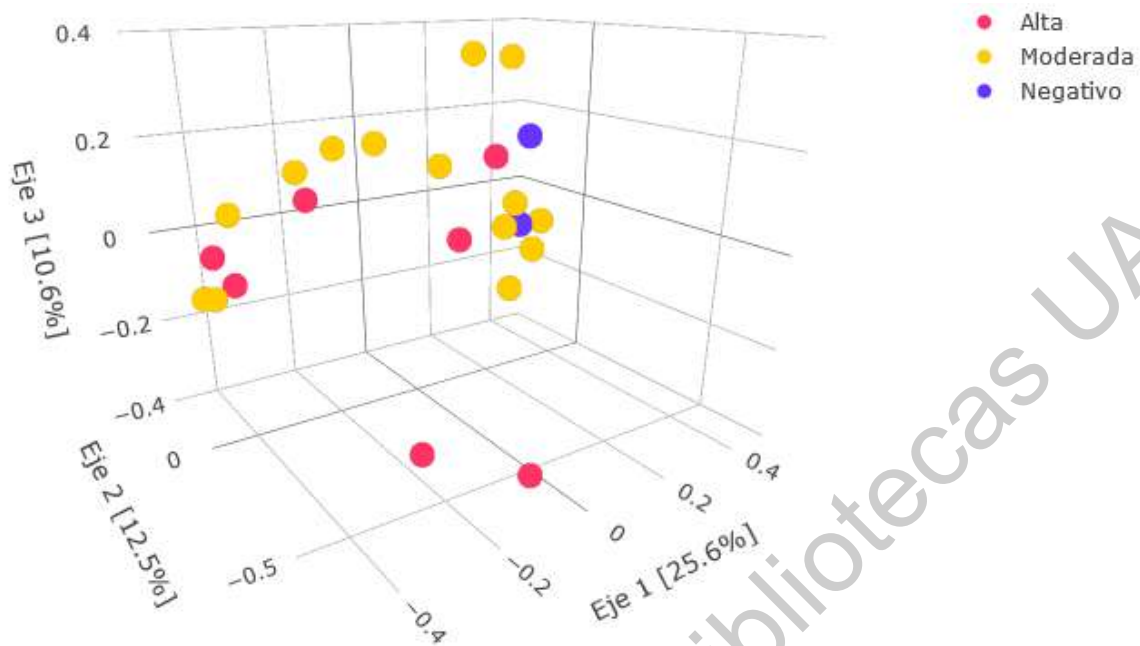


Figura 15. Análisis de PCoA de las muestras de epitelio genital de hembras adultas de *Zalophus californianus*, agrupadas por grado de inflamación

De la clase *Clostridia*, el único género que se encontró en menor abundancia en animales cuyo epitelio cervical presentaba inflamación moderada que en aquellos sin inflamación fue *Fastidiosipila*, el cual también se encontró en menor abundancia en los casos de LSIL. Si tomamos en cuenta la alta prevalencia de OtHV-1 y ZcPV-1 y asumimos que ocasionan algo semejante a lo que ocasionan en el humano, es relevante el que la infección por VPH induce la inflamación al aumentar la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y prostaglandina E₂ (PGE₂), ambas claves en el proceso inflamatorio; y estimula la liberación de citocinas proinflamatorias (Hemmat y Bagui, 2019). También se ha visto que en la infección por ZcPV-1 en el lobo marino de California aumentan significativamente los niveles de transcripción de genes relacionados a citotoxicidad (Peñin et al., 2019). Es probable que las condiciones proinflamatorias afecten la supervivencia de *Fastidiosipila*, y por eso se encuentra en menor abundancia en muestras con algún grado de inflamación y con LSIL, diagnóstico caracterizado por anomalías asociadas a la infección por *Papillomavirus* en el humano (Nayar y Wilbur, 2015). En contraste, los ASVs clasificados como *Blautia*, *Ruminococcaceae* UCG-002,

Ruminococcaceae UCG-005, *Anaerovoracaceae* S5-A14a, *Oscillospiraceae* NK4A214, *Parvimonas*, *Christensenellaceae* R-7, *Candidatus* *Arthromitus*, *Colidextribacter*, *Fournierella*, *Ezakiella*, *Faecalibacterium*, *Negativibacillus*, *Pygmaibacter*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Peptoclostridium*, *Paeniclostridium* y *Paraclostridium*, se encontraron en mayor abundancia en animales con inflamación epitelial moderada, al igual que otros 13 ASVs sin clasificar a nivel de género, los que fueron identificados como *Christensenella minuta*, *Eubacterium coprostanoligenes*, *Eubacterium rumiantium*, *Faecalicatena orotica*, *Negativibacillus massiliensis*, *Paeniclostridium sordellii* y *Tisierella creatinini* (Cuadro 15).

Dos ASVs clasificados como *Clostridium sensu stricto 1* fueron identificados como *Clostridium perfringens*. La relevancia de este hallazgo estriba en que esta bacteria produce una enterotoxina (CPE) que es capaz de activar a YAP1, un regulador transcripcional, e inhibir la vía de señalización Hippo, lo que promueve el crecimiento de células cancerosas, la transición epitelio-mesenquimal y metástasis (Madden, 2002; Nakashima et al., 2020). Además, otras toxinas producidas por esta misma especie (i.e. toxinas alfa y beta), poseen efectos proinflamatorios, lo que podría explicar la mayor abundancia de estos ASVs en muestras de epitelio inflamado (Morris y Fernández-Miyakawa, 2009). Por otro lado, dos ASVs clasificados como *Clostridium sensu stricto 1* fueron identificados como *Clostridium tarantellae*, la cual produce ADNAsas y es un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos (Madden, 2002; Lawson y Rainey, 2016; Cointe et al., 2019).

Paeniclostridium sordellii se ha asociado con shock tóxico y enfermedades inflamatorias en humanos, caballos, rumiantes, cerdos, leones, pelícanos y osos, entre otros (Nyaoke et al., 2020); produce también una toxina (TcsL) que es capaz de promover la apoptosis de linfocitos, e inactiva a las GTPasas Rac, que regulan el citoesqueleto de actina y las uniones intercelulares, lo que aumenta la permeabilidad epitelial (Popoff, 2018), potencialmente interfiriendo en los

mecanismos de barrera, y exponiendo a las células epiteliales a contaminantes ambientales o facilitar la invasión por parte de virus oncogénicos.

Oscillospiraceae NK4A214 y *Blautia* se han encontrado en mayor abundancia en pacientes con cáncer colorrectal, y *Blautia* también está enriquecido en enfermedades inflamatorias intestinales (Mancabelli et al., 2017; Kim et al.,

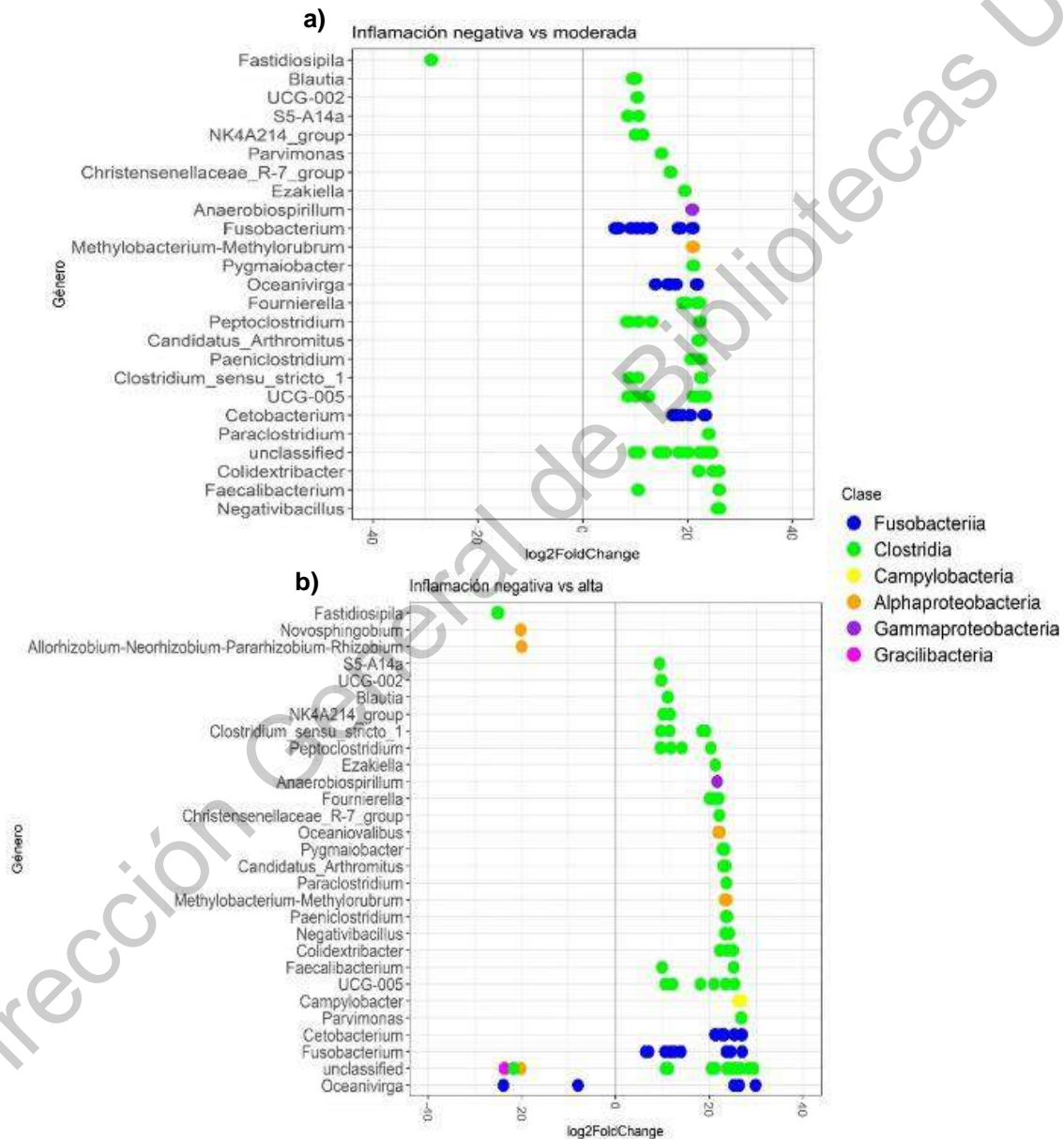


Figura 16. Abundancia diferencial por grado de inflamación epitelial. a) Comparativa entre muestras sin inflamación epitelial y con inflamación moderada. Los valores positivos indican mayor abundancia en muestras negativas a inflamación epitelial, y los negativos, mayor abundancia en muestras con inflamación moderada. b) Comparativa entre muestras negativas a inflamación epitelial y con inflamación alta

2020). Para los géneros *Ruminococcaceae* UCG 002 y *Faecalibacterium* hay información contradictoria, ya que Macabelli et al. (2017) encontraron mayor abundancia de estos géneros en pacientes sin enfermedades inflamatorias intestinales ni cáncer, mientras que Kim et al. (2020) encontraron que la abundancia de estas bacterias era mayor en pacientes con cáncer colorrectal. *Faecalibacterium prausnitzii* es considerado un marcador de buena salud en el microbioma intestinal humano y se ha reportado en mayor abundancia en el microbioma vaginal de mujeres negativas a VPH (Ferreira-Halder et al., 2017; Ritu et al., 2019). *Ezakiella* también se encontró en mayor abundancia en mujeres negativas a VPH (Ferreira-Halder et al., 2017). *Christensenellaceae* R-7 y UCG 005 fueron hallados en mayor abundancia en el microbioma intestinal de pacientes sanos en comparación con aquellos con enfermedad inflamatoria o cáncer, y la propia familia *Christensenellaceae* es considerada un marcador de buena salud en humanos y otras especies (Macabelli et al., 2017; Waters y Ley, 2019), por lo que fue inesperado que estos géneros estuvieran sobrerrepresentados en los lobos marinos con epitelio vaginal inflamado. *Christensenella minuta* produce, entre otros metabolitos, dos ácidos grasos de cadena corta: ácido acético y butírico (Morotomi et al., 2012); en el intestino se sabe que los ácidos grasos de cadena corta tienen efecto anti-inflamatorio, aunque en el epitelio vaginal de mujeres con vaginosis bacteriana son, por el contrario, proinflamatorios (Aldunate et al., 2015). Es posible que estos metabolitos tengan un efecto similar en el epitelio genital del lobo marino y por eso su relación con estados inflamatorios en este trabajo.

La asociación con *Candidatus arthromitus* también fue interesante, ya que antes se mencionó que su abundancia era menor en animales con LSIL y, sin embargo, fue mayor en epitelios con inflamación moderada. Ya que la inflamación crónica está involucrada en el desarrollo de lesiones neoplásicas (Belkaid y Hand, 2014; Garret, 2015), y por lo tanto las precede, es posible que *Candidatus arthromitus* se vea primero favorecido por los cambios en la composición de la microbiota debido a la inflamación epitelial, pero luego los cambios en LSIL ya no favorezcan su proliferación.

Los géneros *Colidextribacter*, *Fournierella*, *Negativibacillus* y *Pygmaibacter* han sido aislados del colon y de heces de humanos (Ricaboni et al., 2016; Bilen et al., 2017; Togo et al., 2017; Ricaboni et al., 2017). *Tisierella creatinini* fue aislada en aguas de desecho de una refinería de azúcar, y *Faecalicatena orotica* de lodo en la bahía de San Francisco (Cato et al., 1968; Farrow et al., 1995; Sakamoto et al., 2017). Es posible que estas bacterias sean habitantes del tubo digestivo de los lobos marinos de California, así como del ambiente marino en el que viven, y aprovechen las alteraciones epiteliales para colonizar el tracto genital.

En cuanto al género *Fusobacterium*, varios reportes lo relacionan con el desarrollo de cáncer. Ya se mencionó antes el papel de *Fusobacterium nucleatum* en la patogenia del cáncer de colon, a través de su adhesina FadA, efecto proinflamatorio y regulación de la respuesta inmune (Rubinstein et al., 2013; Hashemi Goradel et al., 2018; de Carvalho et al., 2019). La especie *F. nucleatum* también es un hallazgo común en pacientes con periodontitis, que puede favorecer la aparición de cáncer por la continua producción de mediadores inflamatorios. También se ha encontrado en mayor abundancia en el microbioma oral de pacientes con carcinoma de células escamosas (Gholizadeh et al., 2016; Zhang et al., 2019). Las especies *F. necrophorum*, *F. mortiferum*, y *F. perfoetens* también se han relacionado con el cáncer colorrectal; y además, diversas especies del género *Fusobacterium* han sido halladas en mayor abundancia en tejido pancreático cancerígeno, en el microbioma gástrico de personas con cáncer gástrico, y en el microbioma vaginal de mujeres con cáncer cervical, en contraste con personas con salud normal (Kostic et al., 2012; Mitsuhashi et al., 2015; Audirac-Chalifour et al., 2016; Hsieh et al., 2018). Basado en lo aquí observado, se sugiere que su presencia en el epitelio cervical del lobo marino de California pudiera ser marcador de transformación epitelial.

Oceanivirga también fue encontrado en mayor abundancia en animales con epitelio inflamado lo que reforzaría la idea antes mencionada de que bajo

ciertas condiciones puede volverse más virulenta y actuar como patógeno. En cuanto a *Cetobacterium*, aunque es parte del microbioma gastrointestinal de algunos mamíferos marinos, peces de agua dulce, humanos y el demonio de Tasmania (Cheng *et al.*, 2015; Bik *et al.*, 2016); se encuentra en mayor abundancia en humanos con cáncer colorrectal (de Carvalho *et al.*, 2019).

Otras de las bacterias que se encontraron en mayor abundancia en epitelio cervical inflamado fueron *Anaerobiospirillum* y *Methylobacterium*. Ambas bacterias tienen asociación con procesos inflamatorios. La primera ha sido encontrada en gatos con ileocolitis y diarrea, perros con peritonitis y diarreas hemorrágicas y en humanos con diarrea y bacteremia asociada a este organismo (de Cock *et al.*, 2004; Courtman, 2016), mientras que *Methylobacterium* es un patógeno oportunista asociado a estados de inmunosupresión, inmunosenescencia, leucemia e insuficiencia renal (Lai *et al.*, 2011). No se encontró evidencia de enfermedad seria, ni de inmunosupresión en los lobos marinos aquí observados, aunque se han reportado estados anérgicos en hembras adultas del Golfo de California (Peñín *et al.*, 2019). Futuros estudios podrían estudiar a mayor detalle su relevancia biológica y clínica en esta especie.

Los resultados en las abundancias diferenciales entre epitelio sin inflamación y con inflamación moderada, y entre epitelio sin inflamación y con inflamación moderada fueron similares en cuanto a las bacterias más y menos abundantes (Fig. 16b y Cuadro 14), por lo que ya solo se comentarán resultados adicionales a los mencionados con anterioridad para epitelios con inflamación moderada. *Novosphingobium* y *Rhizobium* de la clase *Alphaproteobacteria* se encontraron en menor abundancia en muestras de epitelio con inflamación alta. *Novosphingobium* es un género de bacterias que habita ambientes terrestres y marinos, y que tiene la capacidad de degradar diversos compuestos xenobióticos (Wang *et al.*, 2018). Ya que el hábitat de este género de bacterias lo constituyen ambientes marinos es posible que en epitelio sano dichas bacterias puedan adherirse transitoriamente, y que cuando existe inflamación, la competencia entre

especies mutualistas y patógenas impida que estos habitantes ocasionales puedan estar presentes. *Oceaniovalibus* ha sido encontrada en ambientes marinos (Liu et al., 2012), y con este género parece suceder lo contrario, y la inflamación favorecería que colonice el epitelio genital.

El haber detectado *Rhizobium* fue inesperado. Este también es un género de bacterias ambientales, que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, y que suele establecer relaciones simbióticas con plantas leguminosas, pero que también puede vivir en el suelo como saprófito (LeVier et al., 2000; Liu et al., 2015; Poole et al., 2018). Aunque típicamente se piensa en *Rhizobium* como bacteria asociada a la rizósfera, existe también evidencia de la presencia de esta bacteria en nichos distintos, incluyendo ambientes marinos y dulceacuícolas. *Rhizobium flavum*, *R. petrolearium* y *R. borbori* son capaces de degradar triazofos (un organofosforado), hidrocarburos y anilina, respectivamente; y *R. alamii* puede producir exopolisacáridos (Liu et al., 2015). En el microbioma de cultivos de *Ostreococcus tauri* provenientes de muestras del Mediterráneo se encontraron secuencias genéticas que corresponden a genes del sistema de secreción bacteriana de tipo 3 (T3SS), y que, más específicamente, serían cercanas filogenéticamente a un subtipo de T3SS característico del orden *Rhizobiales* (Abby et al., 2014). Adicional a esto, en muestras de agua del Mar del Sur de China se aisló la especie *Rhizobium marinum* (Liu et al., 2015). Además, experimentalmente se ha comprobado que *Rhizobium* es un promotor de crecimiento en cultivos de algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* (Kim et al., 2014). Los ejemplos anteriores demuestran la plasticidad ambiental y metabólica de este género. Filogenéticamente, *Rhizobium* es cercana al patógeno intracelular *Brucella* (LeVier et al., 2000; Poole et al., 2018). *Rhizobium memliloti* codifica una proteína transportadora de membrana (bacA) que posee una similitud de 68.2% con otra proteína de *Brucella abortus*; en ambas especies, dicha proteína es clave en la invasión celular (LeVier et al., 2000), por lo que es posible que bajo ciertas condiciones, *Rhizobium* aún sea capaz de colonizar, al menos temporalmente, tejidos animales, existiendo además precedentes de la presencia de este género

en el ambiente marino donde *Z. californianus* se desenvuelve.

También se encontraron en abundancia relativa menor en hembras con inflamación epitelial alta dos ASVs que solo pudieron clasificarse hasta el nivel taxonómico de Orden como *Absconditabacteriales* (SR1) y otros dos ASVs clasificados dentro de la familia *Peptostreptococcales-Tissierellales* e identificados por BLAST (Zhang et al., 2000) como *Gallicola barnesae* (Cuadro 16), una especie que ha sido aislada de heces de gallinas (Ezaki et al., 2001). El orden *Absconditabacteriales* (SR1) es parte del microbioma oral humano, y un estudio de Tong et al. (2019) encontró una correlación entre su abundancia y la presencia de ACPA, un tipo de anticuerpos usado como marcador de la artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria crónica; aunque en este caso la situación fue contraria, siendo menor su presencia en tejido inflamado. El último ASV encontrado en menor abundancia en lobos marinos de California con inflamación epitelial cervical alta fue identificado como *Yoonia maritima*, el cual también fue encontrado en menor abundancia en hembras con LSIL en comparación con aquellas con epitelio negativo a displasia celular. Es posible que la exposición continua al ambiente marino permita a esta bacteria alojarse en el epitelio genital sano, pero que los cambios que ocurren en presencia de inflamación o alteraciones celulares provocadas por la infección por *Papillomavirus* hagan difícil su permanencia.

En conjunto, *Clostridia* y *Fusobacteriia* se observaron en abundancias relativas mayores en hembras con epitelio inflamado, sin importar el grado de inflamación, y los ASVs pertenecientes a estas clases bacterianas también tuvieron la misma abundancia sin importar el grado de la inflamación. En contraste, la abundancia de *Campylobacter* solo estaba elevada cuando la inflamación del epitelio cervical era alta, lo que concuerda con lo que se observó para epitelios con ASC. Ya que se conoce su capacidad patógena de manera oportunista, es posible que esté actuando de la misma manera en el epitelio inflamado. Otras consistencias entre las condiciones citológicas y los estados inflamatorios fueron la mayor abundancia de *Eubacterium rumiantium*, *Christensenella* y

Negativibacillus. Ya que no se conocen mecanismos de virulencia para estas especies, con base en el resultado observado, se sugiere que el ambiente epitelial alterado por inflamación o atipia celular favorece la invasión por parte de ellas.

Cuadro 13. Abundancia diferencial entre muestras sin inflamación y con inflamación moderada.				
ASV	Clase	Género	Log2 fold change	P
ASV147	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	21.086	7.2e-07
ASV165	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	20.985	8.4e-07
ASV103	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	9.917	0.0014
ASV97	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	10.098	0.0024
ASV94	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	9.738	0.0080
ASV100	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	9.511	0.0130
ASV183	<i>Clostridia</i>	<i>Candidatus Arthromitus</i>	22.315	3.9e-05
ASV213	<i>Clostridia</i>	<i>Candidatus Arthromitus</i>	22.045	4.8e-05
ASV289	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	16.743	0.0021
ASV257	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	16.703	0.0022
ASV173	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	22.748	2.8e-05
ASV176	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	22.510	3.3e-05
ASV17	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	10.479	0.0024
ASV19	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	8.897	0.0100
ASV42	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>	24.848	2.3e-13
ASV45	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>	25.905	7.0e-13
ASV192	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>	22.152	4.5e-05
ASV200	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>	22.106	4.6e-05
ASV576	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>	19.458	0.0003
ASV33	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>	26.023	8.3e-15
ASV30	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>	10.592	0.0002
ASV280	<i>Clostridia</i>	<i>Fastidiosipila</i>	-28.887	3.9e-08
ASV145	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>	21.757	2.1e-06
ASV323	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>	22.254	4.1e-05
ASV302	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>	19.729	0.0003
ASV310	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>	19.105	0.0004
ASV39	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>	25.697	1.5e-12
ASV44	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>	26.060	2.4e-12
ASV54	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214 group</i>	11.450	0.0013
ASV56	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214 group</i>	10.049	0.0035
ASV231	<i>Clostridia</i>	<i>Paeniclostridium</i>	22.500	2.2e-06

Nota: Un valor de Log2 fold change positivo indica que ese ASV es más abundante en muestras con inflamación moderada, y un valor negativo indica que ese ASV es menos abundante en dicha condición, y por lo tanto más abundante en muestras negativas a inflamación epitelial

Cuadro 13. Abundancia diferencial entre muestras sin inflamación y con inflamación moderada (Continuación).

ASV	Clase	Género	Log2 fold change	P
ASV253	<i>Clostridia</i>	<i>Paeniclostridium</i>	20.688	5.6e-06
ASV135	<i>Clostridia</i>	<i>Paraclostridium</i>	24.032	9.1e-07
ASV134	<i>Clostridia</i>	<i>Parvimonas</i>	15.028	0.0058
ASV219	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>	22.295	2.9e-07
ASV8	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>	13.101	1.1e-06
ASV6	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>	10.714	1.8e-06
ASV181	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>	8.453	0.0021
ASV196	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>	8.844	0.0122
ASV198	<i>Clostridia</i>	<i>Pygmaobacter</i>	21.115	0.0001
ASV204	<i>Clostridia</i>	<i>Pygmaobacter</i>	21.055	0.0001
ASV114	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerovoracaceae S5-A14a</i>	10.632	0.0009
ASV102	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerovoracaceae S5-A14a</i>	8.595	0.0076
ASV107	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-002</i>	10.435	0.0048
ASV106	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-002</i>	10.444	0.0066
ASV131	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	23.372	4.2e-09
ASV133	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	23.321	6.6e-08
ASV143	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	21.859	2.1e-07
ASV74	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	22.296	4.4e-07
ASV22	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	12.518	3.2e-05
ASV26	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	12.405	6.7e-05
ASV87	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	21.137	9.8e-05
ASV43	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	10.121	0.0014
ASV46	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	8.673	0.0043
ASV34	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	24.580	4.3e-14
ASV48	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	24.494	1.6e-11
ASV136	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	23.679	9.3e-06
ASV206	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	22.899	2.4e-05
ASV151	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	22.707	2.9e-05
ASV155	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	22.377	3.7e-05
ASV15	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	20.036	0.0002
ASV16	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	18.382	0.0007
ASV31	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	9.915	0.0011
ASV47	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	10.751	0.0029
ASV264	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	15.742	0.0039
ASV277	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	15.530	0.0044
ASV138	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	14.515	0.0078
ASV61	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	20.524	1.2e-07

Cuadro 13. Abundancia diferencial entre muestras sin inflamación y con inflamación moderada (Continuación).

ASV	Clase	Género	Log2 fold change	P
ASV71	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	20.417	9.8e-07
ASV29	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	23.374	1.6e-06
ASV27	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	23.214	1.0e-05
ASV500	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	18.900	0.0005
ASV379	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	18.689	0.0006
ASV372	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	17.753	0.0011
ASV589	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	17.650	0.0012
ASV355	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	17.247	0.0015
ASV7	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	12.988	1.5e-07
ASV9	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	11.486	3.2e-06
ASV21	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	13.033	1.8e-05
ASV23	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	12.960	2.1e-05
ASV82	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	20.859	2.3e-05
ASV81	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	21.021	0.0001
ASV1	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	6.532	0.0005
ASV194	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	18.676	0.0006
ASV212	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	18.250	0.0008
ASV57	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	10.344	0.0013
ASV2	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	6.211	0.0013
ASV72	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	6.883	0.0017
ASV50	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	9.228	0.0028
ASV79	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	6.420	0.0035
ASV13	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	21.853	5.1e-06
ASV14	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	21.709	6.3e-05
ASV121	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	16.266	0.0002
ASV229	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	17.785	0.0005
ASV236	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	16.731	0.0006
ASV104	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	13.909	0.0107
ASV203	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Anaerobiospirillum</i>	20.894	0.0001

Cuadro 14. Abundancia diferencial entre muestras sin inflamación y con inflamación alta.

ASV	Clase	Género	Log2 fold change	P
ASV189	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	-20.029	4.9e-05
ASV165	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	23.252	2.2e-07
ASV147	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	23.760	1.2e-07
ASV207	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Novosphingobium</i>	-20.202	4.1e-05
ASV484	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Oceaniovalibus</i>	21.890	0.0001
ASV560	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Oceaniovalibus</i>	22.316	9.9e-05
ASV223	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sin clasificar</i>	-20.193	5.7e-05
ASV167	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>	26.157	5.0e-06
ASV148	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>	26.864	2.8e-06
ASV100	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	11.091	0.0059
ASV94	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	11.154	0.0038
ASV103	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	11.171	0.0006
ASV97	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>	11.224	0.0013
ASV213	<i>Clostridia</i>	<i>Candidatus Arthromitus</i>	22.996	6.0e-05
ASV183	<i>Clostridia</i>	<i>Candidatus Arthromitus</i>	23.490	4.2e-05
ASV289	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	22.108	0.0001
ASV257	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenellaceae R-7 group</i>	22.210	0.0001
ASV19	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	9.629	0.0081
ASV17	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	11.555	0.0014
ASV173	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	18.443	0.0013
ASV176	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	19.240	0.0008
ASV192	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>	22.267	0.0001
ASV200	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>	22.365	9.6e-05
ASV42	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>	23.837	2.1e-11
ASV45	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>	25.084	3.8e-11
ASV576	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>	21.296	0.0002
ASV30	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>	9.942	0.0010
ASV33	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>	25.217	7.7e-13
ASV280	<i>Clostridia</i>	<i>Fastidiosipila</i>	-25.286	6.3e-06
ASV233	<i>Clostridia</i>	<i>Fastidiosipila</i>	-24.932	8.5e-06
ASV145	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>	20.075	3.3e-05
ASV323	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>	20.938	0.0003
ASV302	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>	22.004	0.0001
ASV310	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>	22.060	0.0001
ASV44	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>	23.390	2.2e-09
ASV39	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>	24.280	2.0e-10
ASV56	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214 group</i>	10.171	0.0049

Nota: Un valor de Log2 fold change positivo indica que ese ASV es más abundante en muestras con inflamación alta, y un valor negativo indica que ese ASV es menos abundante en dicha condición, y por lo tanto más abundante en muestras negativas a inflamación epitelial

Cuadro 14. Abundancia diferencial entre muestras sin inflamación y con inflamación alta (Continuación).

ASV	Clase	Género	Log2 fold change	P
ASV54	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214 group</i>	11.642	0.0018
ASV253	<i>Clostridia</i>	<i>Paeniclostridium</i>	23.540	9.5e-07
ASV231	<i>Clostridia</i>	<i>Paeniclostridium</i>	23.893	1.9e-06
ASV135	<i>Clostridia</i>	<i>Paraclostridium</i>	23.666	4.6e-06
ASV132	<i>Clostridia</i>	<i>Parvimonas</i>	26.757	3.0e-06
ASV134	<i>Clostridia</i>	<i>Parvimonas</i>	26.897	2.7e-06
ASV181	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>	9.545	0.0009
ASV196	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>	9.732	0.0087
ASV6	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>	11.822	4.9e-07
ASV8	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>	14.180	4.5e-07
ASV219	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>	20.351	9.1e-06
ASV204	<i>Clostridia</i>	<i>Pygmaobacter</i>	22.821	6.9e-05
ASV198	<i>Clostridia</i>	<i>Pygmaobacter</i>	23.309	4.8e-05
ASV114	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerovoracaceae S5-A14a</i>	9.420	0.0051
ASV107	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-002</i>	9.668	0.0131
ASV106	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-002</i>	9.812	0.0154
ASV46	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	10.603	0.0009
ASV26	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	12.143	0.0002
ASV43	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	12.147	0.0003
ASV22	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	12.199	0.0001
ASV143	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	18.110	4.9e-05
ASV74	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	20.997	6.5e-06
ASV131	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	23.519	2.0e-08
ASV133	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	23.531	2.3e-07
ASV87	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>	25.445	9.0e-06
ASV246	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	-21.752	0.0001
ASV243	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	-21.662	0.0001
ASV47	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	10.646	0.0051
ASV31	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	11.264	0.0004
ASV151	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	20.494	0.0004
ASV155	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	20.651	0.0003
ASV206	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	21.253	0.0002
ASV136	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	23.810	2.5e-05
ASV48	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	24.099	2.9e-10
ASV277	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	24.785	1.5e-05
ASV264	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	24.909	1.4e-05
ASV139	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	25.232	1.1e-05
ASV34	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	25.738	4.7e-14
ASV138	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	26.648	3.3e-06

Cuadro 14. Abundancia diferencial entre muestras sin inflamación y con inflamación alta (Continuación).

ASV	Clase	Género	Log2 fold change	P
ASV16	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	28.460	6.9e-07
ASV15	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	29.448	2.8e-07
ASV589	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	21.228	0.0002
ASV500	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	21.489	0.0002
ASV379	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	22.643	7.8e-05
ASV372	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	23.079	5.7e-05
ASV355	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	23.236	5.0e-05
ASV71	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	25.304	8.4e-09
ASV61	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	25.430	4.5e-10
ASV29	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	26.903	1.7e-07
ASV27	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>	27.021	1.1e-06
ASV2	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	6.422	0.0017
ASV79	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	6.700	0.0039
ASV1	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	6.763	0.0007
ASV72	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	7.071	0.0023
ASV50	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	10.550	0.0011
ASV57	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	11.622	0.0005
ASV21	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	12.581	7.9e-05
ASV9	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	12.600	9.6e-07
ASV23	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	12.632	7.7e-05
ASV7	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	13.973	5.5e-08
ASV199	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	23.635	3.7e-05
ASV212	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	24.504	1.9e-05
ASV194	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	24.547	1.8e-05
ASV184	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	24.569	1.8e-05
ASV81	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	26.995	2.5e-06
ASV82	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>	27.028	2.0e-07
ASV254	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	-23.936	1.9e-05
ASV301	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	-8.001	0.0113
ASV236	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	25.276	8.0e-07
ASV229	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	25.319	2.4e-06
ASV121	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	26.376	1.2e-08
ASV104	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	26.426	4.0e-06
ASV14	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	29.870	1.9e-07
ASV13	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	29.898	3.4e-09
ASV203	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Anaerobiospirillum</i>	21.690	0.0002
ASV113	<i>Gracilibacteria</i>	<i>Sin clasificar</i>	-23.669	2.4e-05
ASV117	<i>Gracilibacteria</i>	<i>Sin clasificar</i>	-23.638	2.4e-05

Cuadro 15. ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras sin inflamación y con inflamación moderada.

ASV	Clase	Especie	Query coverage	e-value	Porcentaje de identidad
ASV15	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	8e-24	85.71%
ASV16	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	2e-125	85.95%
ASV264	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	4e-122	85.48%
ASV277	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	8e-124	85.71%
ASV47	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	100.00%	0	96.22%
ASV48	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	100.00%	0	95.98%
ASV138	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium rumiantium</i>	100.00%	0	94.06%
ASV31	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalicatena orotica</i>	100.00%	0	97.87%
ASV34	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalicatena orotica</i>	100.00%	0	97.63%
ASV206	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus massiliensis</i>	100.00%	3e-177	93.16%
ASV136	<i>Clostridia</i>	<i>Paeniclostridium sordelii</i>	100.00%	0	99.52%
ASV151	<i>Clostridia</i>	<i>Tisierella creatinini</i>	100.00%	3e-162	91.21%
ASV155	<i>Clostridia</i>	<i>Tisierella creatinini</i>	100.00%	2e-160	90.97%

Cuadro 16. ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras sin inflamación y con inflamación alta.

ASV	Clase	Género	Query coverage	e-value	Porcentaje de identidad
ASV223	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Yoonia maritima</i>	100.00%	0	97.14%
ASV15	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	8e-24	85.71%
ASV16	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	2e-125	85.95%
ASV264	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	4e-122	85.48%
ASV277	<i>Clostridia</i>	<i>Christensenella minuta</i>	100.00%	8e-124	85.71%
ASV47	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	100.00%	0	96.22%
ASV48	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	100.00%	0	95.98%
ASV138	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium rumiantium</i>	100.00%	0	94.06%
ASV139	<i>Clostridia</i>	<i>Eubacterium rumiantium</i>	100.00%	0	93.82%
ASV31	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalicatena orotica</i>	100.00%	0	97.87%
ASV34	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalicatena orotica</i>	100.00%	0	97.63%
ASV243	<i>Clostridia</i>	<i>Gallicola barnesae</i>	100.00%	5e-141	87.86%
ASV246	<i>Clostridia</i>	<i>Gallicola barnesae</i>	100.00%	2e-139	87.62%
ASV206	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus massiliensis</i>	100.00%	3e-177	93.16%
ASV136	<i>Clostridia</i>	<i>Paeniclostridium sordelii</i>	100.00%	0	99.52%
ASV151	<i>Clostridia</i>	<i>Tissierella creatinini</i>	100.00%	3e-162	91.21%
ASV155	<i>Clostridia</i>	<i>Tissierella creatinini</i>	100.00%	2e-160	90.97%
ASV113	<i>Gracilibacteria</i>	<i>Oribacterium sinus</i>	100.00%	5e-61	77.00%
ASV117	<i>Gracilibacteria</i>	<i>Oribacterium sinus</i>	100.00%	2e-59	76.76%

Objetivo 4. Investigar la asociación del microbioma cervical con la infección por virus de potencial oncogénico.

Los espectros de diversidad de Rényi mostraron que la diversidad alfa difiere entre muestras negativas y positivas a OthV-1, siendo mayor en las positivas (Fig. 17), mientras que en términos de la infección por ZcPV-1 no se encontraron diferencias en la diversidad alfa (Fig. 18).

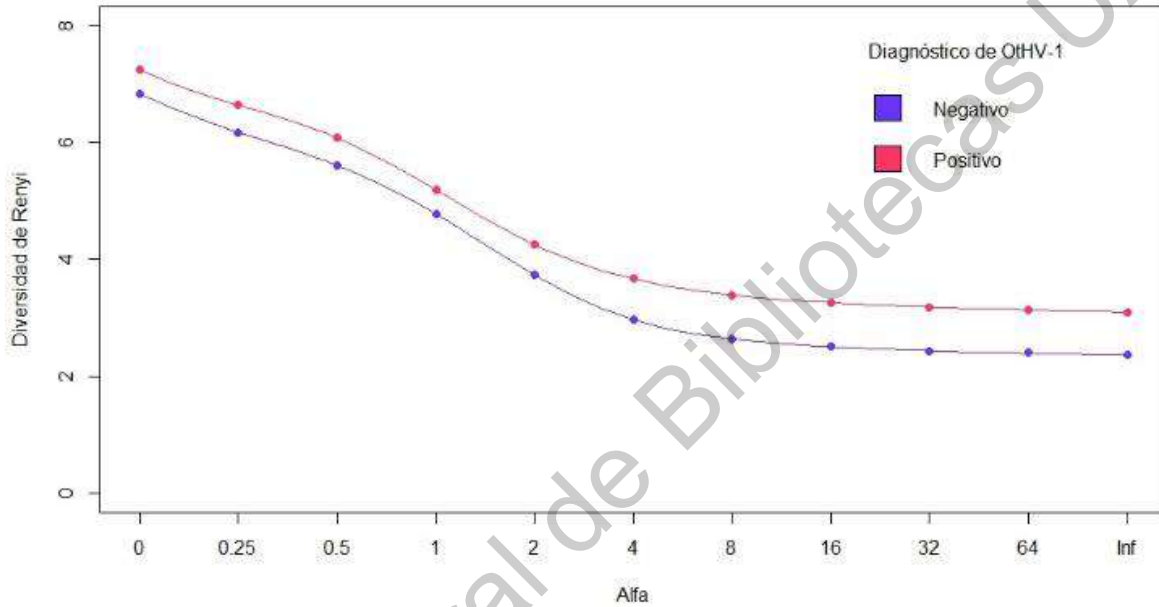


Figura 17. Espectros de entropía de Rényi agrupados por diagnóstico de OthV-1.

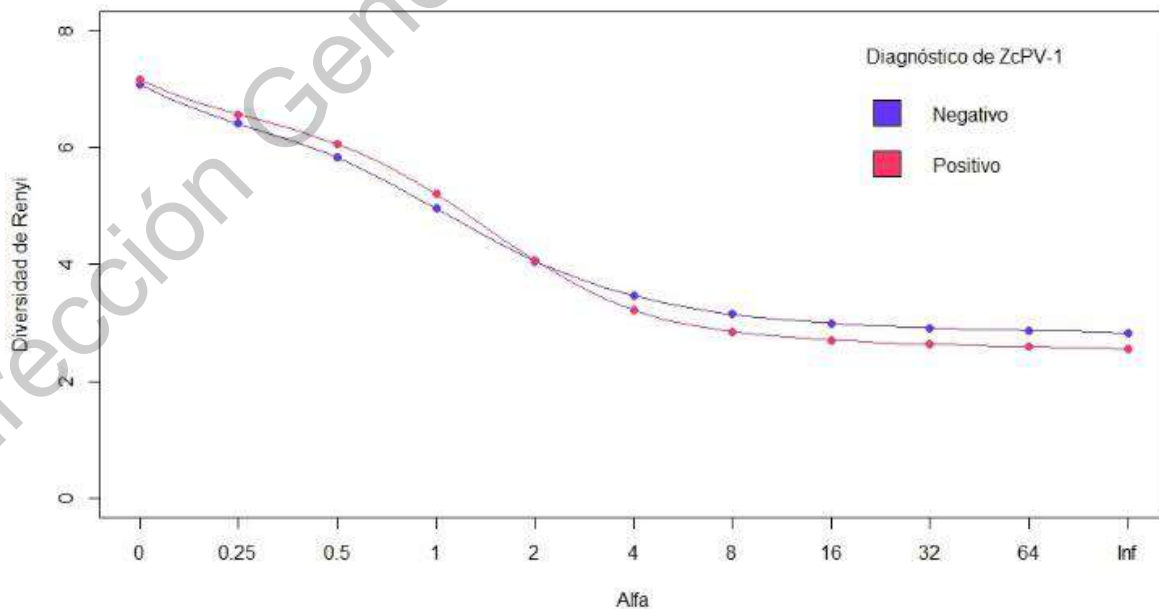


Figura 18. Espectros de entropía de Rényi agrupados por diagnóstico de ZcPV-1.

En términos de diversidad beta, no se encontraron diferencias significativas en el epitelio de acuerdo a la presencia o ausencia de ZcPV-1 (Fig. 19 y 20, y Cuadro 17), pero en cuanto al diagnóstico de OtHV-1 se encontraron diferencias marginalmente significativas. Es probable que esto refleje el bajo número de muestras que no permitió tener un alto poder estadístico.

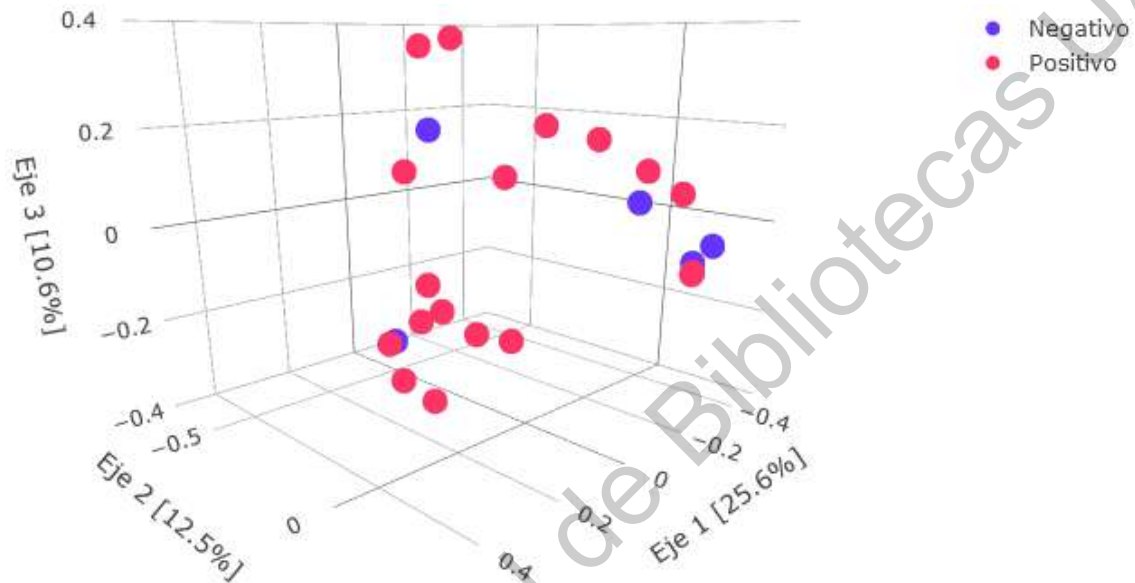


Figura 19. Análisis de PCoA de las muestras de epitelio genital de hembras adultas de *Zalophus californianus*, agrupadas por diagnóstico de OtHV-1

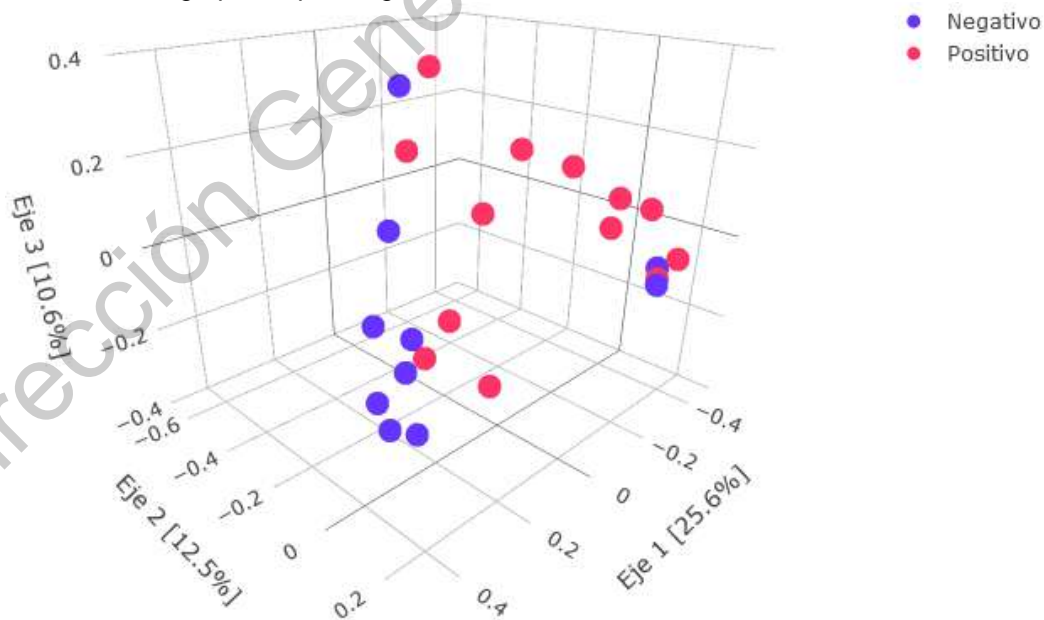


Figura 20. Análisis de PCoA de las muestras de epitelio genital de hembras adultas de *Zalophus californianus*, agrupadas por diagnóstico de ZcPV-1

Cuadro 17. Resultados del PERMANOVA según diagnóstico de virus potencialmente oncogénicos			
Variable	F	R ²	P
Diagnóstico de OtHV-1	1.63845	0.06544	0.0685
Diagnóstico de ZcPV-1	1.48541	0.05933	0.1083

Anaerobiospirillum fue encontrado en menor abundancia en hembras sin evidencia de infección por OtHV-1 (Cuadro 18 y Fig. 21), lo que contrasta con su mayor abundancia en presencia de inflamación (Fig. 16). Algo similar sucede con ASVs sin clasificar a nivel de género, identificados por BLAST como *Y. maritima* y *G. barnesae* (Cuadro 20), que tenían menor abundancia en estados inflamatorios, mientras que en presencia de OtHV-1 su abundancia fue mayor, o *R. cellobioparum*, que tuvo menor abundancia en animales diagnosticados con LSIL, y mayor en casos de infección por OtHV-1. Los gammaherpesvirus, familia a la que pertenece el OtHV-1 (King et al., 2002) están relacionados con oncogénesis en pacientes con inmunosupresión, como el herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi (KSHV) y el gammaherpesvirus de *Felis catus* 1 (FcaGHV-1) (Feng et al., 2013; Ertl et al., 2015). Exhiben tropismo hacia células epiteliales y linfocitos B, y pueden interferir con diversos mecanismos inmunes innatos y adaptativos (Feng et al., 2013). Se sabe que el KSHV, el Virus de Epstein Barr (EBV), y el herpesvirus

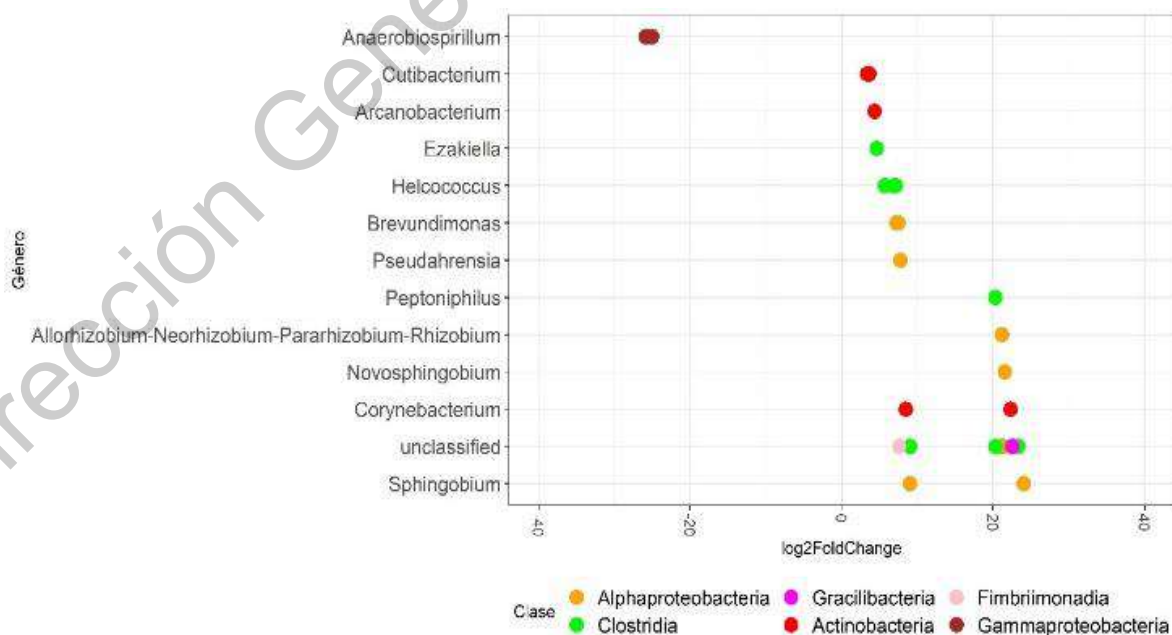


Figura 21. Abundancia diferencial en muestras de epitelio genital de hembras adultas de *Zolophus californianus*, agrupadas por diagnóstico de OtHV-1; positivo vs. negativo.

Cuadro 18. Abundancia diferencial entre muestras con diagnóstico positivo y negativo a OthV-1

ASV	Clase	Género	Log2 fold change	p
ASV24	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>	4.357	0.0069
ASV186	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium</i>	22.293	1.1e-14
ASV190	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium</i>	8.472	0.0013
ASV60	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cutibacterium</i>	3.663	0.0029
ASV59	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cutibacterium</i>	3.371	0.0076
ASV189	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	21.163	4.4e-11
ASV221	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>	7.485	0.0056
ASV230	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>	7.242	0.0072
ASV207	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Novosphingobium</i>	21.547	2.1e-11
ASV122	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pseudahrensia</i>	7.764	0.0002
ASV77	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingobium</i>	24.039	1.4e-22
ASV130	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingobium</i>	9.015	0.0002
ASV223	<i>Alphaproteobacteria</i>	Sin clasificar	21.062	9.6e-11
ASV222	<i>Alphaproteobacteria</i>	Sin clasificar	21.023	9.0e-11
ASV11	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>	4.642	0.0052
ASV36	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>	7.146	7.8e-06
ASV40	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>	6.961	2.2e-05
ASV70	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>	5.739	0.0081
ASV62	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>	5.701	0.0046
ASV188	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>	20.323	1.9e-08
ASV137	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	23.341	1.1e-10
ASV128	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	22.713	3.3e-10
ASV124	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	21.320	4.2e-11
ASV246	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	20.347	1.8e-08
ASV243	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	20.307	2.0e-08
ASV126	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar	9.056	0.0051
ASV238	<i>Fimbriimonadia</i>	Sin clasificar	7.637	0.0073
ASV485	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Anaerobiospirillum</i>	-25.012	1.4e-12
ASV442	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Anaerobiospirillum</i>	-25.683	3.5e-13
ASV393	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Anaerobiospirillum</i>	-25.895	2.3e-13
ASV117	<i>Gracilibacteria</i>	Sin clasificar	22.564	4.3e-10
ASV113	<i>Gracilibacteria</i>	Sin clasificar	22.538	4.5e-10

Nota: Un valor de Log2 fold change positivo indica que ese ASV es más abundante en muestras con diagnóstico positivo a OthV-1, y un valor negativo indica que ese ASV es menos abundante en dicha condición, y por lo tanto más abundante en muestras con diagnóstico negativo a OthV-1

murino 68 (MHV68) son capaces de inhibir vías de señalización de los procesos de autofagia y apoptosis, y codifican productos genéticos que imitan o neutralizan mediadores inflamatorios, inhibiendo la respuesta inflamatoria y citotóxica (Feng et al., 2013). Se sabe que los lobos marinos infectados por OtHV-1 poseen niveles de transcripción de genes relacionados a citotoxicidad similares o más bajos que los no infectados, mientras en la infección por ZcPV-1 estos niveles están significativamente elevados (Peñin et al., 2019). Esto puede explicar por qué varias bacterias exhiben patrones de abundancia opuestas en la infección por OtHV-1 en relación con estados inflamatorios o con LSIL, caracterizado por lesiones típicamente asociadas a infecciones por *Papillomavirus*, que a su vez inducen inflamación en los tejidos afectados (Nayar y Wilbur, 2015; Hemmat y Bagui, 2019).

En cuando al ASV238, sin clasificar a nivel de género, se le encontró similitud con *Fimbrimonas ginsengisoli* (Cuadro 19), un organismo de origen ambiental (Im et al., 2012). Como sucede con otros organismos de origen ambiental encontrados en menor abundancia en muestras con alteraciones epiteliales, es posible que *F. ginsengisoli* colonice de manera transitoria el epitelio genital, y que los cambios producidos por la infección por OtHV-1 hagan que sea desplazada por otras especies.

Cuadro 19. ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras con diagnóstico negativo y positivo a OtHV-1

ASV	Clase	Especie	Query coverage	e-value	Porcentaje de identidad
ASV222	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Yoonia maritima</i>	100.00%	0	97.38%
ASV223	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Yoonia maritima</i>	100.00%	0	97.14%
ASV243	<i>Clostridia</i>	<i>Gallicola barnesae</i>	100.00%	5e-141	87.86%
ASV246	<i>Clostridia</i>	<i>Gallicola barnesae</i>	100.00%	2e-139	87.62%
ASV128	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminiclostridium cellobioparum</i>	100.00%	3e-123	85.65%
ASV137	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminiclostridium cellobioparum</i>	100.00%	1e-121	85.41%
ASV124	<i>Clostridia</i>	<i>Tissierella creatinini</i>	100.00%	3e-162	91.21%
ASV126	<i>Clostridia</i>	<i>Tissierella creatinini</i>	100.00%	2e-160	90.97%
ASV238	<i>Fimbriimonadia</i>	<i>Fimbriimonas ginsengisoli</i>	100.00%	1e-166	91.78%
ASV113	<i>Gracilibacteria</i>	<i>Oribacterium sinus</i>	100.00%	5e-61	77.00%
ASV117	<i>Gracilibacteria</i>	<i>Oribacterium sinus</i>	100.00%	2e-59	76.76%

Cutibacterium acnes es parte del microbioma de la piel en el humano, pero también ha sido relacionado con inflamación crónica en la próstata, que llevaría al desarrollo de neoplasias prostáticas malignas (Ugge et al., 2018). *Brevundimonas* es un patógeno oportunista, en su mayoría en pacientes con patologías previas, incluyendo algunos tipos de cáncer (Ryan y Pembroke, 2018). *Pseudahrensia* es un género que hasta ahora se había reportado en ambientes marinos y en el intestino de cefalópodos alrededor de la península de Corea (Jung et al., 2012; Kim et al., 2016). *Sphingobium fontiphilum* se encontró por primera vez en ambientes acuáticos en Taiwán (Sheu et al., 2013).

El género *Corynebacterium* es parte del microbioma de la piel, mucosas y ojos del humano, además de ser patógenos oportunistas en algunos casos de pacientes inmunocomprometidos y enfermos de cáncer (Samuel et al., 2019). Específicamente, *C. tuberculostearicum*, con quien los dos ASVs identificados en este estudio guardan una gran similitud (100% y 99.77% de identidad, con un *e-value* de 0 para ambos ASV's, y un *query coverage* de 100%), se ha asociado con paniculitis pancreática y desórdenes inflamatorios de la glándula mamaria y senos nasales; además puede promover la producción de citocinas y otros mediadores proinflamatorios en la piel a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Altonsy et al., 2020). El ASV identificado como *Arcanobacterium*, presentó el mismo porcentaje de similitud (99.06%, *e-value* de 0 para ambas posibilidades), con *A. phocae* y *A. phocisimile*. La primera fue aislada en muestras nasales, fecales e hisopados vaginales de individuos de foca de puerto, *Phoca vitulina*, aparentemente sanas, aunque luego fue aislada de heridas, abscesos y órganos internos en varias especies de mamíferos marinos varados en las costas de California, EE UU, incluyendo al lobo marino de California (Johnson et al., 2003). Por otro lado, *A. phocisimile* fue aislada de la vagina de un individuo de *Phoca vitulina* del mar del norte (Hijazin et al., 2013). Aquí cabe resaltar que los ASVs clasificados como *Cutibacterium* y *Arcanobacterium*, que difirieron en abundancia de acuerdo a la presencia/ausencia de OtHV-1, se identificaron como parte del microbioma núcleo. En cuanto al género *Helcococcus*, dos ASV's de los que

aumentan su abundancia en presencia de OthV-1 también conforman parte del microbioma núcleo. El hecho de que estas especies hayan sido encontradas tanto en animales sanos como en procesos inflamatorios y que, al menos en el caso de *C. tuberculostearicum*, incluso se hayan descrito mecanismos proinflamatorios, implica que estas tienen la capacidad de co-habitar diversos sitios anatómicos sin causar patología, pero que cambios en las condiciones ambientales pueden hacer que manifiesten características patológicas.

Las muestras cervicales de hembras con infección por ZcPV1 tuvieron cinco ASVs en menor abundancia que las muestras negativas (Fig. 22 y Cuadro 20). Estos correspondían al género *Oceanivirga*, a dos ASVs del orden *Absoconditabacteriales SR1* y a uno identificado como *Negativibacillus* (Cuadro 21). *Oceanivirga* había sido encontrado en mayor abundancia en individuos con diagnóstico citológico de ASC, y con epitelio inflamado, por lo que es posible que encuentre condiciones adecuadas para su proliferación bajo condiciones de inflamación y displasia celular, pero que durante infecciones concomitantes con ZcPV-1, el epitelio cervical tenga condiciones ligeramente distintas, que hagan que bajo dicha condición le sea más difícil proliferar. Por el contrario, las bacterias del orden *Absoconditabacteriales* eran menos abundantes en animales con inflamación alta, y *Negativibacillus* tuvo mayor abundancia en hembras con alteraciones citológicas o epitelio inflamado. En general hubo pocas diferencias entre muestras negativas y positivas a ZcPV-1, pero solo tres muestras eran positivas únicamente a ZcPV-1, mientras que diez eran positivas a ambos virus, y ocho solo a OthV-1. El

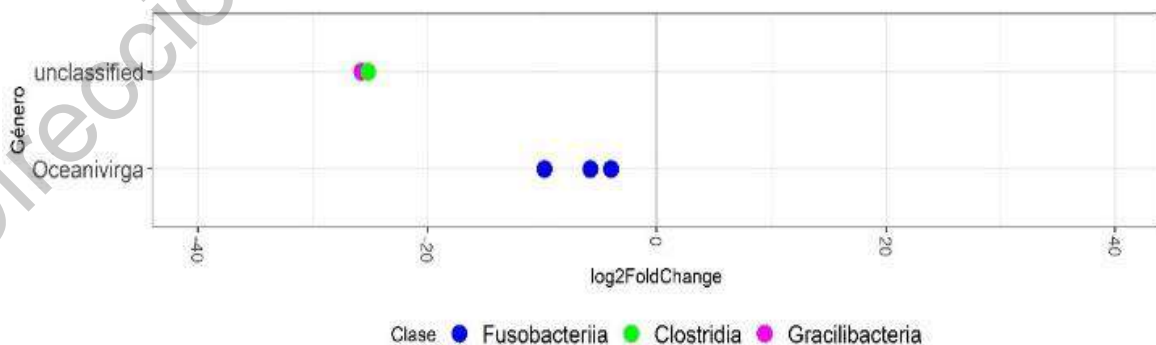


Figura 22. Abundancia diferencial en muestras de epitelio genital de hembras adultas de *Zalophus californianus*, agrupadas por diagnóstico de ZcPV-1; positivo vs. negativo

estudio de Peñin et al (2019) encontró que los niveles de transcripción de genes relacionados a citotoxicidad en infecciones simultáneas con OtHV-1 y ZcPV-1 eran similares a los de infecciones solo por OtHV-1; es posible que el número considerable de co-infecciones en las muestras de este estudio enmascare las verdaderas diferencias en el microbioma entre animales con y sin infección por ZcPV-1.

Cuadro 20. Abundancia diferencial entre muestras con diagnóstico positivo y negativo a ZcPV-1

ASV	Clase	Género	Log2 fold change	P
ASV113	<i>Gracilibacteria</i>	<i>Sin clasificar</i>	-25.718	4.2e-18
ASV117	<i>Gracilibacteria</i>	<i>Sin clasificar</i>	-25.735	4.0e-18
ASV206	<i>Clostridia</i>	<i>Sin clasificar</i>	-25.163	2.1e-17
ASV96	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	-9.777	0.0004
ASV301	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	-5.773	0.0004
ASV3	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	-3.961	0.0007
ASV4	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>	-3.974	0.0008

Nota: Un valor de Log2 fold change positivo indica que ese ASV es más abundante en muestras con diagnóstico positivo a ZcPV-1, y un valor negativo indica que ese ASV es menos abundante en dicha condición, y por lo tanto más abundante en muestras con diagnóstico negativo a ZcPV-1

Cuadro 21. ASVs sin clasificar a nivel de género y especies con las que tienen mayor similitud de acuerdo a la herramienta en línea BLAST, en la comparativa entre muestras con diagnóstico negativo y positivo a ZcPV-1

ASV	Clase	Especie	Query coverage	e-value	Porcentaje de identidad
ASV113	<i>Gracilibacteria</i>	<i>Oribacterium sinus</i>	100.00%	5e-61	77.00%
ASV117	<i>Gracilibacteria</i>	<i>Oribacterium sinus</i>	100.00%	2e-59	76.76%
ASV206	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus massiliensis</i>	100.00%	3e-177	93.16%

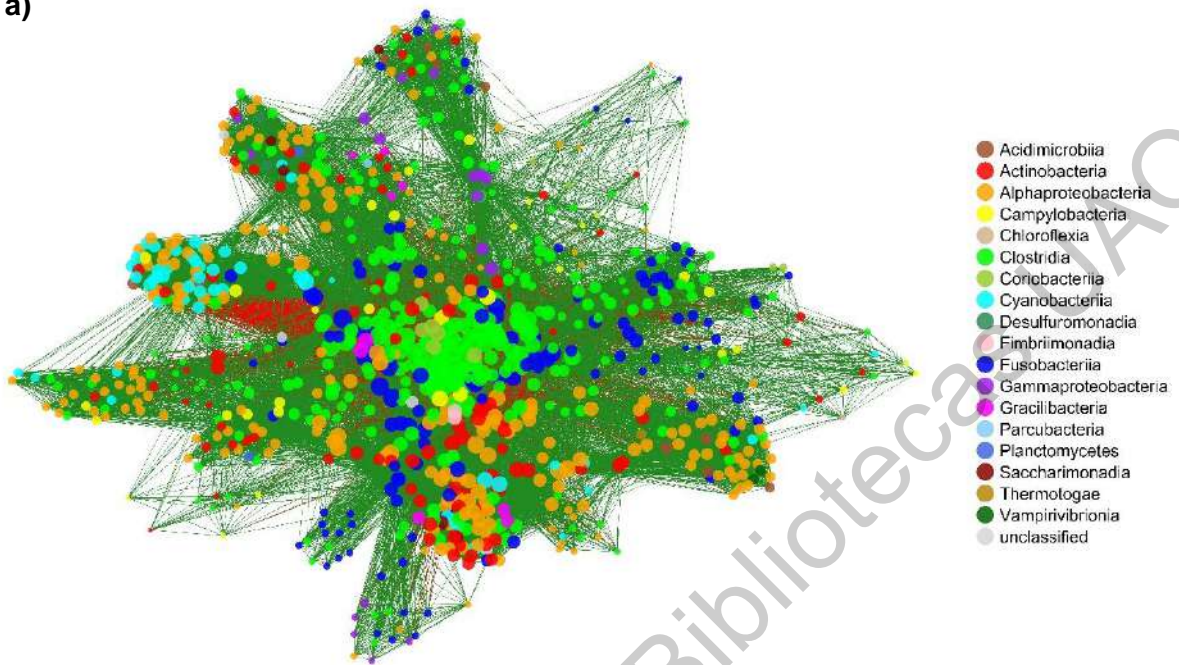
Objetivo 5. Identificar relaciones de co-ocurrencia entre los miembros de la comunidad bacteriana en hembras sanas, con transformación pre-oncogénica, e infectadas con virus oncogénicos

En el modelado de redes se pudo apreciar que las clases *Fusobacteriia* y *Clostridia*, que se identificaron como un componente importante del microbioma, se agruparon en el centro de la red (Fig. 23a), mientras las otras clases tendían a estar en la periferia. Esta red representa relaciones de co-ocurrencia; y permite inferir posibles interacciones ecológicas entre los miembros de la comunidad (Layeghifard et al., 2018; Castro-Nallar et al., 2019).

Las redes están compuestas por distintos módulos de microorganismos altamente interconectados entre sí, además de organismos que conectan estos módulos, y que son muy importantes para la estructura y, por lo tanto, para la comunidad, conocidos como especies clave o *Keystone species* (Layeghifard et al., 2018; Castro-Nallar et al., 2019). Para identificar estas especies clave es necesario analizar las características de los distintos nodos, especialmente la conectividad y la centralidad (Layeghifard et al., 2018; Castro-Nallar et al., 2019). En este caso se tomaron en cuenta el *degree* o grado y el *betweenness* o intermediación como medidas de conectividad y centralidad respectivamente. El grado es el número de conexiones con otros nodos; y la intermediación representa el número de rutas más cortas entre todos los otros nodos, que pasan por uno en particular (Layeghifard et al., 2018; Castro-Nallar et al., 2019).

El grado promedio de la red fue de 71.91076, y la intermediación promedio fue de 584.4359. Para buscar las especies clave se buscaron aquellos ASVs que tuvieran grado e intermediación mayores al promedio más dos desviaciones estándar, es decir, valores por encima de 149.6062 y 2623.831 respectivamente. Se identificaron 21 especies clave (Fig. 23b y Cuadro 22), de las cuales 11 coincidieron con ASVs que conformaban el microbioma núcleo. Esto refuerza la evidencia de que las especies clave inferidas a partir de la construcción de la red de co-ocurrencia poseen una fuerte relevancia ecológica en la comunidad.

a)



b)

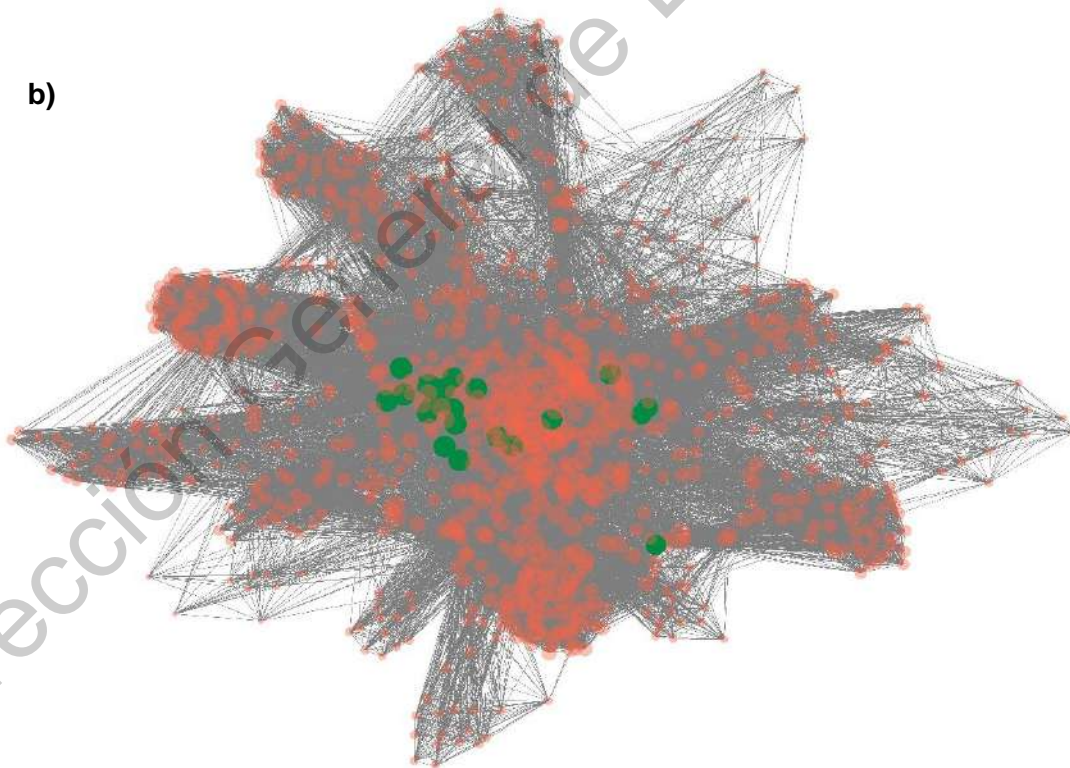


Figura 23. Red de co-ocurrencia bacteriana. a) Cada punto representa un ASV, y el tamaño de cada uno esta en función del *degree*. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo). b) En verde están marcadas las *especies clave* y en rojo las demás especies de la comunidad.

Algunos de estos organismos, como se había comentado antes, varían en su abundancia de acuerdo al estado del epitelio: *F. perfoetens*, *F. mortiferum*, *C. hiranonis* y *P. cinnamivorans* en ASC, LSIL y estados inflamatorios. Y *F. orotica* y *B. hominis* en mayor abundancia en animales con epitelio inflamado. Distintas especies de *Fusobacterium*, y *B. hominis* están relacionadas con el cáncer colorrectal en humanos (Kostic et al., 2012; Mancabelli et al., 2017; Kim et al., 2020). *Clostridium hiranonis* posee rutas metabólicas capaces de producir ácidos biliares secundarios a partir de ácidos biliares primarios, los cuales son co-carcinógenos involucrados en el desarrollo del cáncer colorrectal (Kitahara et al., 2001). *Fusobacterium orotica* es una bacteria ambiental (Sakamoto et al., 2017) y *P. cinnamivorans* se ha encontrado en menor abundancia en personas con enfermedades inflamatorias intestinales o cáncer (Mancabelli et al., 2017).

Cuadro 22. ASVs identificados como especies clave

ASV	Clase	Especie	Query coverage	e-value	Porcentaje de identidad
ASV1	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	100%	0	98.11%
ASV2	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	100%	0	97.87%
ASV3	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga salmonicida</i>	100%	6e-175	92.77%
ASV4	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga salmonicida</i>	100%	3e-173	92.54%
ASV6	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium hiranonis</i>	100%	0	100%
ASV7	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	100%	0	99.76%
ASV8	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium hiranonis</i>	100%	0	99.76%
ASV9	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	100%	0	99.53%
ASV21	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	100%	0	94.81%
ASV22	<i>Clostridia</i>	<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	100%	7e-174	92.45%
ASV23	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	100%	0	94.58%
ASV26	<i>Clostridia</i>	<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	100%	3e-172	99.22%
ASV31	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalicatena orotica</i>	100%	0	97.87%
ASV34	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalicatena orotica</i>	100%	0	97.63%
ASV43	<i>Clostridia</i>	<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	100%	2e-170	91.98%
ASV72	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	100%	0	97.87%
ASV78	<i>Clostridia</i>	<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	100%	2e-179	92.45%
ASV79	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium perfoetens</i>	100%	0	97.64%
ASV94	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia hominis</i>	100%	0	99.76%
ASV181	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium hiranonis</i>	100%	0	99.76%
ASV340	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	100%	0	99.52%

En una red pueden existir varios módulos conformados por grupos de nodos que están fuertemente relacionados entre sí, y que se relacionan en menor medida con otros nodos que no pertenecen al mismo módulo (Layeghifard *et al.*, 2018; Castro-Nallar *et al.*, 2019). Se puede medir qué tan fuerte es la división en módulos, o modularidad, de tal manera que un valor alto implica que la red posee conexiones densas entre ciertos grupos de nodos, y escasas conexiones entre esos grupos (Castro-Nallar *et al.*, 2019). En la red resultante de este estudio se identificaron nueve módulos (Fig. 24), de los cuales los 1, 3, 7 y 9 contienen las especies clave; la modularidad de la red es de 0.5163, y visualmente se puede observar que se pueden distinguir agrupaciones de algunos ASVs, pero estas agrupaciones se solapan entre sí.

Los resultados del presente estudio apuntan a que varias especies, a pesar de poseer diversos mecanismos por los que pueden promover la carcinogénesis, son también parte importante del microbioma en estados de eubiosis. También se

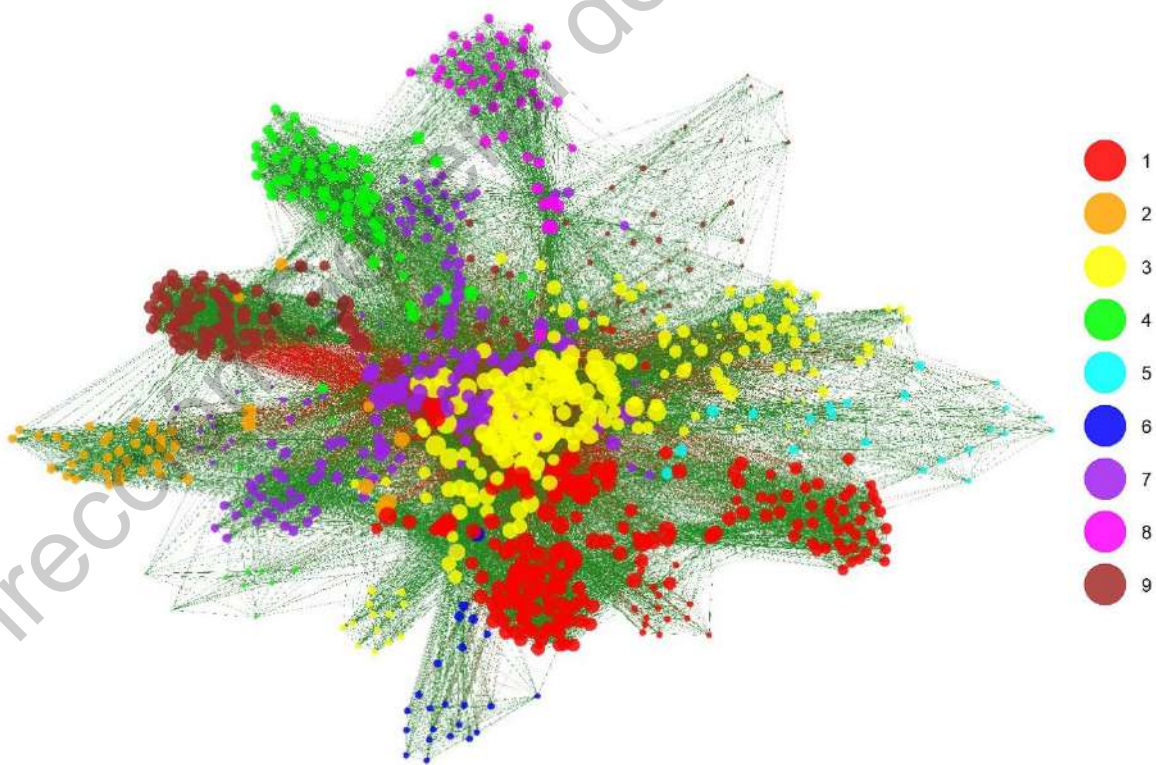


Figura 24. Red de co-ocurrencia bacteriana, con los nodos (ASV's) coloreados según el módulo al que pertenecen. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo).

puede observar que la mayoría de las especies clave pertenecen a las clases *Clostridia* y *Fusobacteriia*, lo que hace evidente la importancia de estas en el microbioma vaginal de esta especie.

También se modelaron redes de acuerdo al diagnóstico citológico, grado de inflamación y diagnóstico de virus oncogénicos. No había suficientes muestras de animales sin inflamación para el modelado de la red, por lo que no se incluyeron en la comparativa. Las redes para las distintas condiciones de salud epitelial pueden observarse en las figuras 25 a 33. Los cuadros 23 a 31 muestran las especies clave para cada una de las variables de salud epitelial. Aunque estos resultados aún tendrían que validarse con un mayor número de muestra para cada condición, muestran que las clases *Clostridia* y *Fusobacteriia* son importantes tanto en estados saludables como en condiciones de epitelio alterado o infecciones por virus oncogénicos. De esta manera, para el lobo marino de California no solo las bacterias presentes, sino también las relaciones entre ellas, son importantes para el mantenimiento de la salud epitelial en el tracto genital.

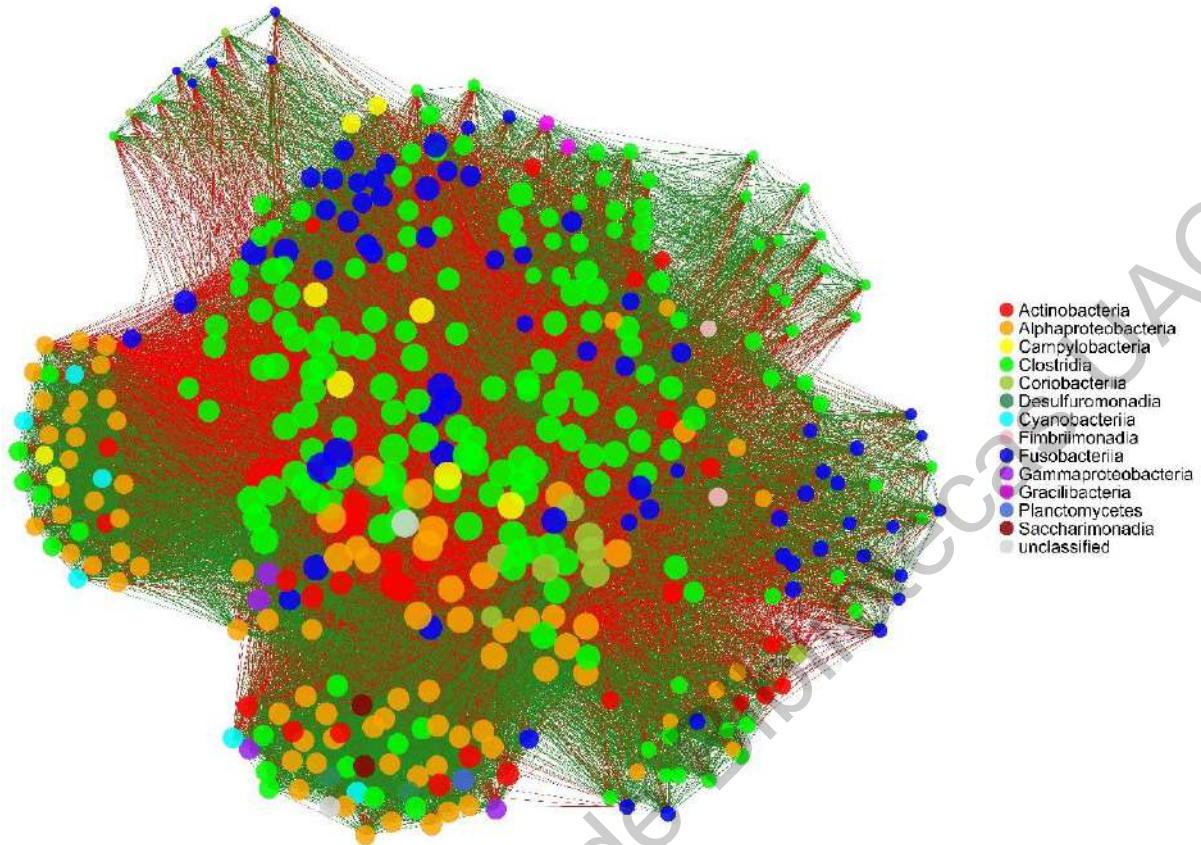


Figura 25. Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico citológico de ASC. Cada punto representa un ASV, y el tamaño de cada uno esta en función del *degree*. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo).

Cuadro 23. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico citológico de ASC

ASV	Clase	Género
ASV158	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcus</i>
ASV89	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
ASV93	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
ASV366	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pedomicrobium</i>
ASV119	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>
ASV100	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV94	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV42	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>
ASV237	<i>Clostridia</i>	<i>Tuzzerella</i>
ASV239	<i>Clostridia</i>	<i>Tuzzerella</i>
ASV133	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV31	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV34	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar

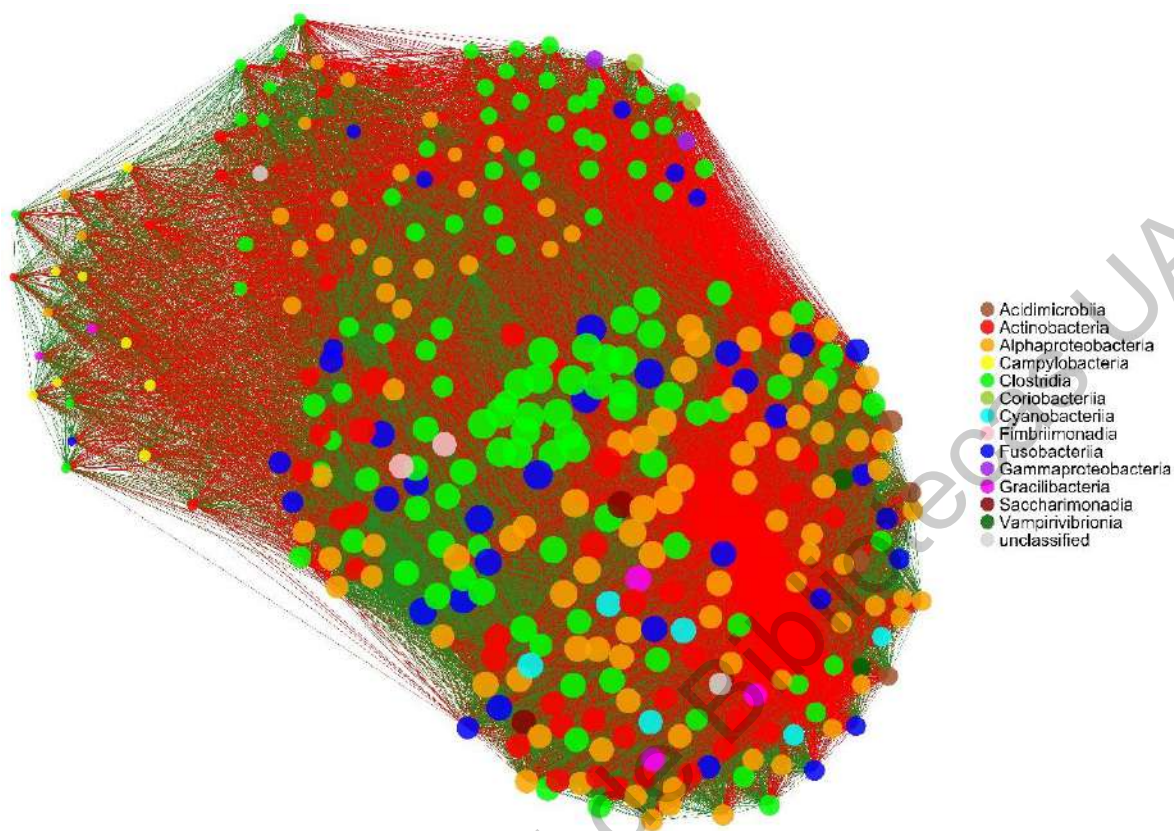


Figura 26. Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico citológico de LSIL. Cada punto representa un ASV, y el tamaño de cada uno esta en función del *degree*. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo).

Cuadro 24. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico citológico de LSIL

ASV	Clase	Género
ASV28	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV32	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV39	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>
ASV44	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>
ASV135	<i>Clostridia</i>	<i>Paraclostridium</i>
ASV219	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV66	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV131	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV34	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV136	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV149	<i>Fusobacteria</i>	<i>Oceanivirga</i>

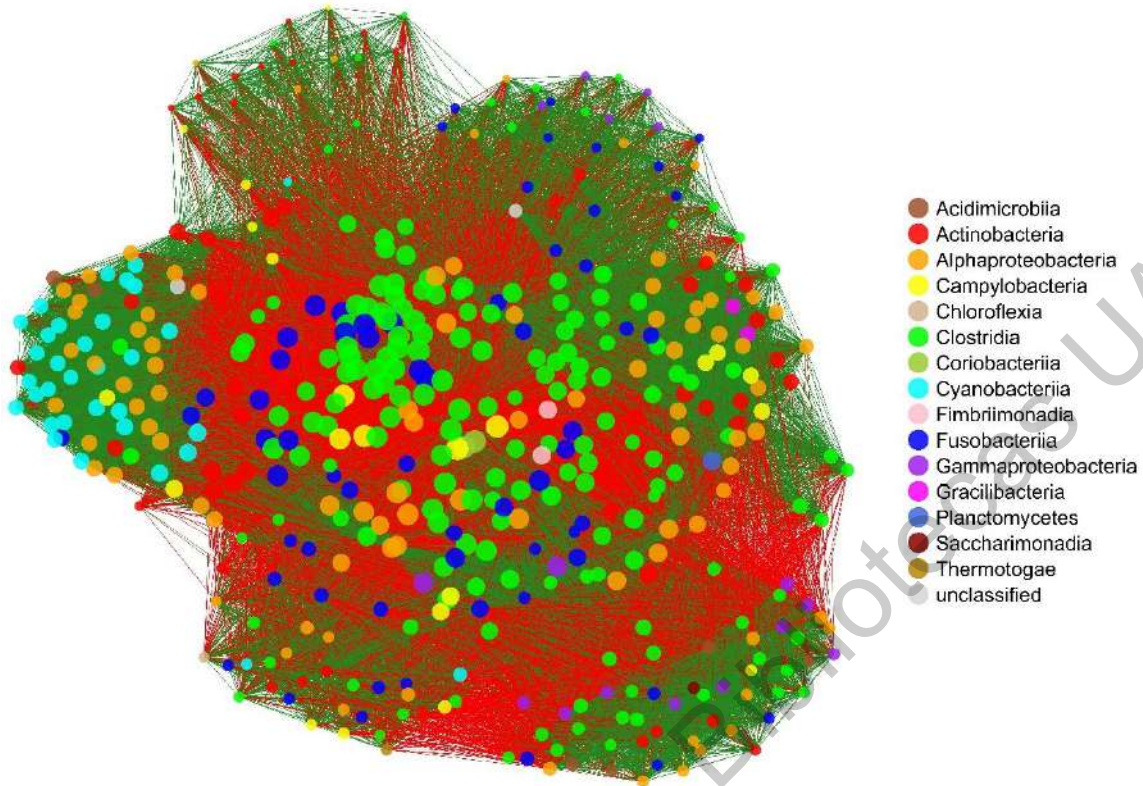


Figura 27. Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico citológico negativo a displasia epitelial. Cada punto representa un ASV, y el tamaño de cada uno esta en función del *degree*. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo).

Cuadro 25. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de <i>Zalophus californianus</i> con diagnóstico citológico negativo a displasia epitelial		
ASV	Clase	Género
ASV217	<i>Campylobacteria</i>	<i>Helicobacter</i>
ASV266	<i>Campylobacteria</i>	<i>Helicobacter</i>
ASV17	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
ASV19	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
ASV411	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV498	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV152	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Collinsella</i>
ASV163	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Collinsella</i>

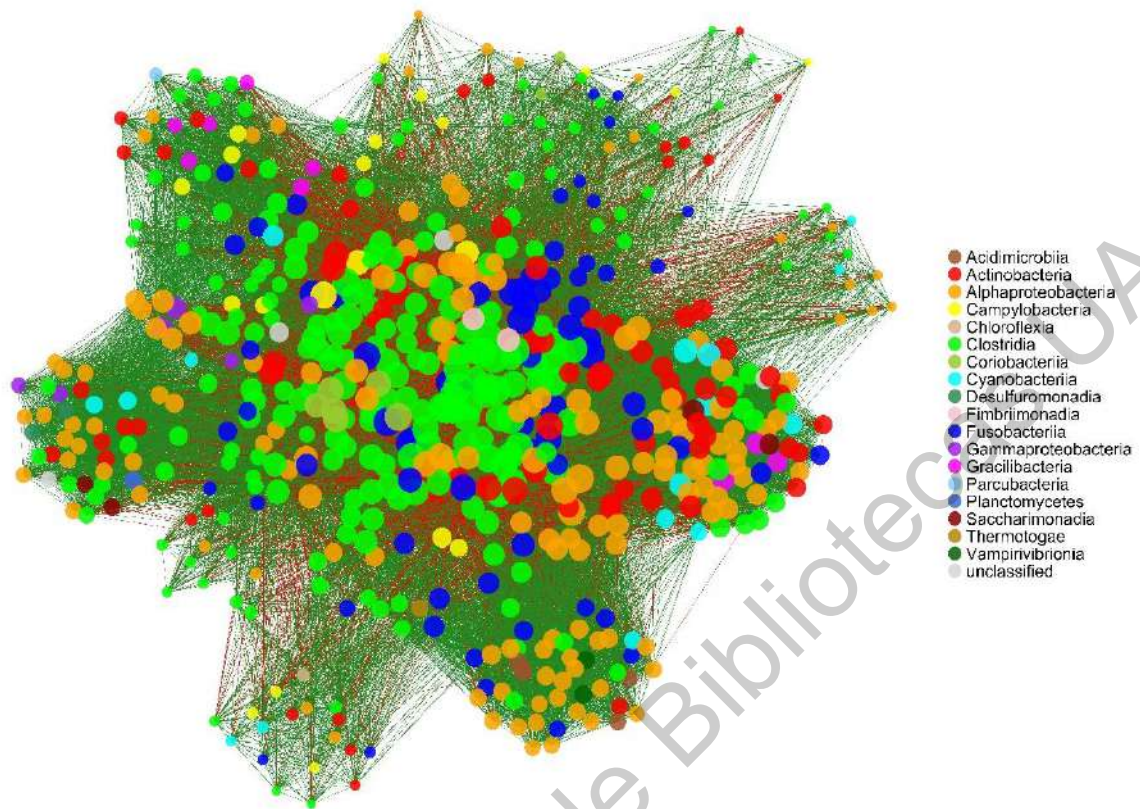


Figura 28. Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con inflamación epitelial moderada. Cada punto representa un ASV, y el tamaño de cada uno está en función del *degree*. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo).

Cuadro 26. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con inflamación epitelial moderada.

ASV	Clase	Género
ASV24	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV25	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV157	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcus</i>
ASV158	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcus</i>
ASV273	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcus</i>
ASV327	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>
ASV340	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>
ASV386	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gemmobacter</i>
ASV389	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gemmobacter</i>
ASV291	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Paracoccus</i>
ASV681	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Shinella</i>
ASV177	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>
ASV359	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerococcus</i>
ASV94	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>

Cuadro 26. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con inflamación epitelial moderada (Continuación).

ASV	Clase	Género
ASV97	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV100	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV103	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV17	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
ASV19	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
ASV42	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>
ASV45	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>
ASV30	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>
ASV33	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>
ASV28	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV32	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV39	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>
ASV44	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>
ASV54	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214</i>
ASV56	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214</i>
ASV95	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillibacter</i>
ASV98	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillibacter</i>
ASV135	<i>Clostridia</i>	<i>Paraclostridium</i>
ASV196	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV102	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerovoracaceae S5-A14a</i>
ASV114	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerovoracaceae S5-A14a</i>
ASV22	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV26	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV43	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV46	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV53	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV55	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV131	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV133	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV193	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV227	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV31	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV34	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV136	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV152	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Collinsella</i>
ASV163	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Collinsella</i>
ASV272	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Collinsella</i>
ASV191	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Slackia</i>
ASV197	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Slackia</i>

Cuadro 26. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con inflamación epitelial moderada (Continuación).

ASV	Clase	Género
ASV61	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Cetobacterium</i>
ASV1	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV9	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV21	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV23	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV72	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV79	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV422	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV3	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV4	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV13	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV14	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV149	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV154	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>

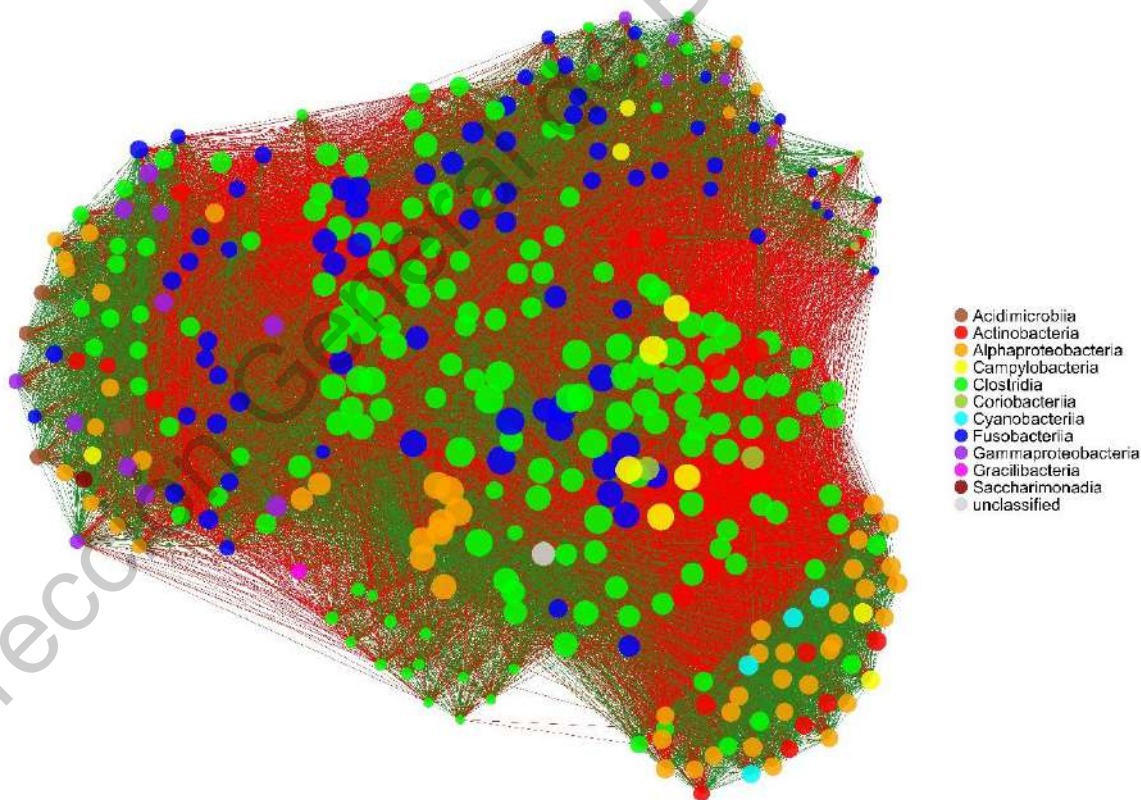


Figura 29. Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con inflamación epitelial alta. Cada punto representa un ASV, y el tamaño de cada uno esta en función del *degree*. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo).

Cuadro 27. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con inflamación epitelial alta.

ASV	Clase	Género
ASV93	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
ASV147	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>
ASV165	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>
ASV484	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Oceaniovalibus</i>
ASV560	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Oceaniovalibus</i>
ASV111	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>
ASV119	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>
ASV217	<i>Campylobacteria</i>	<i>Helicobacter</i>
ASV17	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
ASV19	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
ASV11	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>
ASV651	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>
ASV30	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>
ASV302	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>
ASV310	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>
ASV36	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV40	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV62	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV70	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV231	<i>Clostridia</i>	<i>Paeniclostridium</i>
ASV253	<i>Clostridia</i>	<i>Paeniclostridium</i>
ASV181	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV196	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV219	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV83	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>
ASV92	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>
ASV102	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerovoracaceae S5-A14a</i>
ASV114	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerovoracaceae S5-A14a</i>
ASV53	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV55	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV78	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV47	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV48	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV108	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV118	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV123	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV129	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV241	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar

Cuadro 27. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con inflamación epitelial alta (Continuación).

ASV	Clase	Género
ASV65	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcaceae W/5053</i>
ASV75	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcaceae W/5053</i>
ASV1	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV2	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV9	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV72	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV79	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV170	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV3	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV4	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>

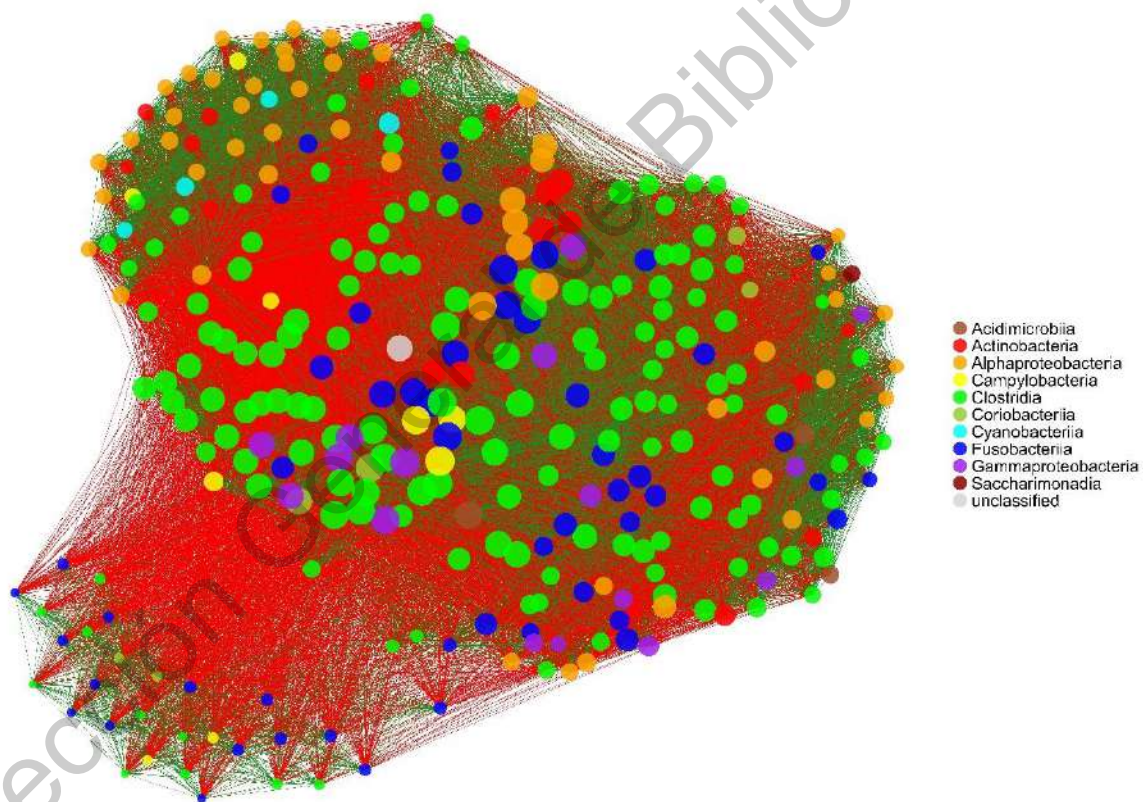


Figura 30. Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico de OtHV-1 negativo. Cada punto representa un ASV, y el tamaño de cada uno está en función del *degree*. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo).

Cuadro 28. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico de OthV-1 negativo.

ASV	Clase	Género
ASV1068	<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Ilumatobacter</i>
ASV25	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV59	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cutibacterium</i>
ASV60	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cutibacterium</i>
ASV147	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>
ASV165	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>
ASV560	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Oceaniovalibus</i>
ASV111	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>
ASV119	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>
ASV5	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>
ASV10	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>
ASV984	<i>Campylobacteria</i>	<i>Helicobacter</i>
ASV192	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>
ASV200	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>
ASV576	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>
ASV651	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>
ASV30	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>
ASV159	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>
ASV162	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>
ASV256	<i>Clostridia</i>	<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>
ASV258	<i>Clostridia</i>	<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>
ASV533	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillibacter</i>
ASV83	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>
ASV92	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>
ASV102	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerovoracaceae S5-A14a</i>
ASV43	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV46	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV66	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV74	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV87	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV193	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV227	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV411	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV498	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV152	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Collinsella</i>
ASV163	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Collinsella</i>
ASV1	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV2	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>

Cuadro 28. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico de OthV-1 negativo (Continuación).

ASV	Clase	Género
ASV7	Fusobacteriia	Fusobacterium
ASV72	Fusobacteriia	Fusobacterium
ASV79	Fusobacteriia	Fusobacterium
ASV252	Fusobacteriia	Fusobacterium
ASV396	Fusobacteriia	Fusobacterium
ASV3	Fusobacteriia	Oceanivirga
ASV4	Fusobacteriia	Oceanivirga
ASV220	Gammaproteobacteria	Anaerobiospirillum
ASV295	Gammaproteobacteria	Anaerobiospirillum
ASV393	Gammaproteobacteria	Anaerobiospirillum
ASV442	Gammaproteobacteria	Anaerobiospirillum
ASV485	Gammaproteobacteria	Anaerobiospirillum
ASV613	Gammaproteobacteria	Anaerobiospirillum
ASV127	Sin clasificar	Sin clasificar

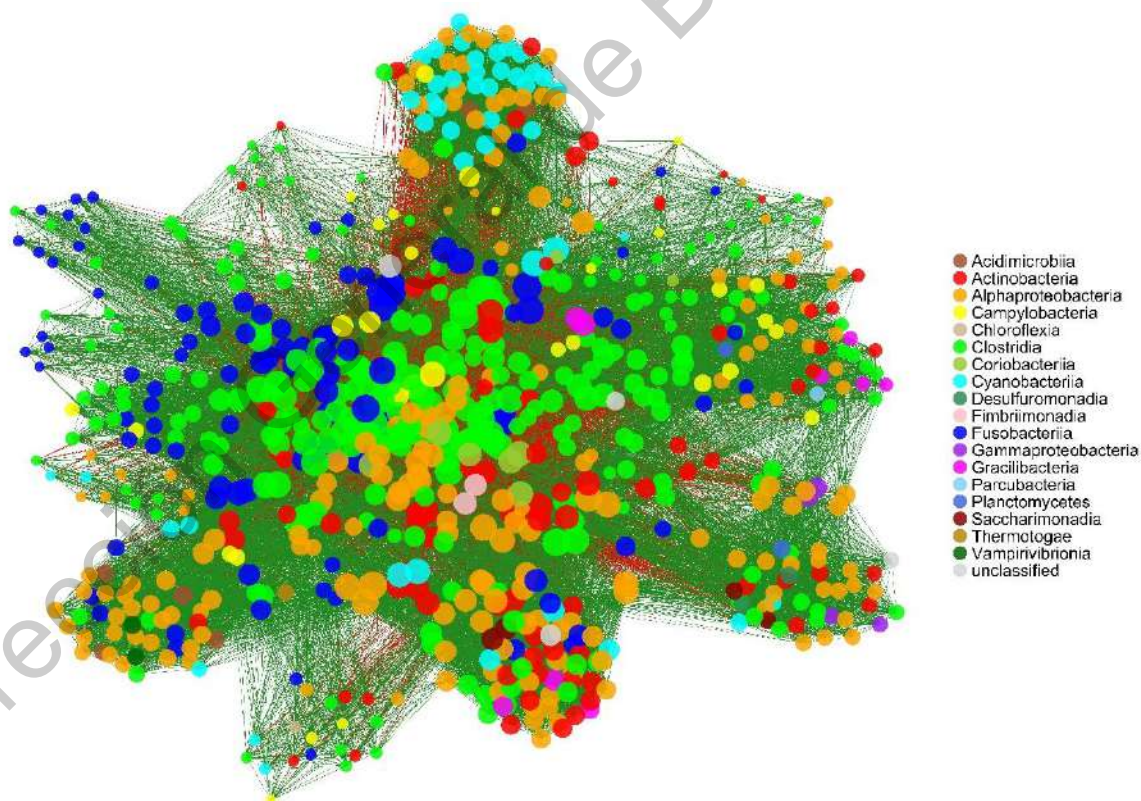


Figura 31. Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico de OthV-1 positivo. Cada punto representa un ASV, y el tamaño de cada uno esta en función del *degree*. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo).

Cuadro 29. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico de OthV-1 positivo.

ASV	Clase	Género
ASV24	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV25	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV292	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV303	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV488	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
ASV327	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>
ASV340	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>
ASV386	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gemmobacter</i>
ASV389	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Gemmobacter</i>
ASV420	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Paracoccus</i>
ASV459	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Paracoccus</i>
ASV681	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Shinella</i>
ASV10	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>
ASV94	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV100	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV103	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV42	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>
ASV328	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>
ASV302	<i>Clostridia</i>	<i>Fournierella</i>
ASV36	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV40	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV85	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV28	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV32	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV39	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>
ASV44	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>
ASV54	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214</i>
ASV56	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214</i>
ASV6	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV8	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV181	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV196	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV219	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV22	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV26	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV43	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV46	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>

Cuadro 29. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico de OthV-1 positivo (Continuación).

ASV	Clase	Género
ASV55	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV53	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV193	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV227	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV31	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV163	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Collinsella</i>
ASV191	<i>Coriobacteriia</i>	<i>Slackia</i>
ASV503	<i>Cyanobacteriia</i>	<i>Pleurocapsa PCC-7319</i>
ASV582	<i>Cyanobacteriia</i>	<i>Pleurocapsa PCC-7319</i>
ASV1	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV2	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV7	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV9	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV21	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV23	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV72	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV79	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV3	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV4	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV149	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV299	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV301	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>

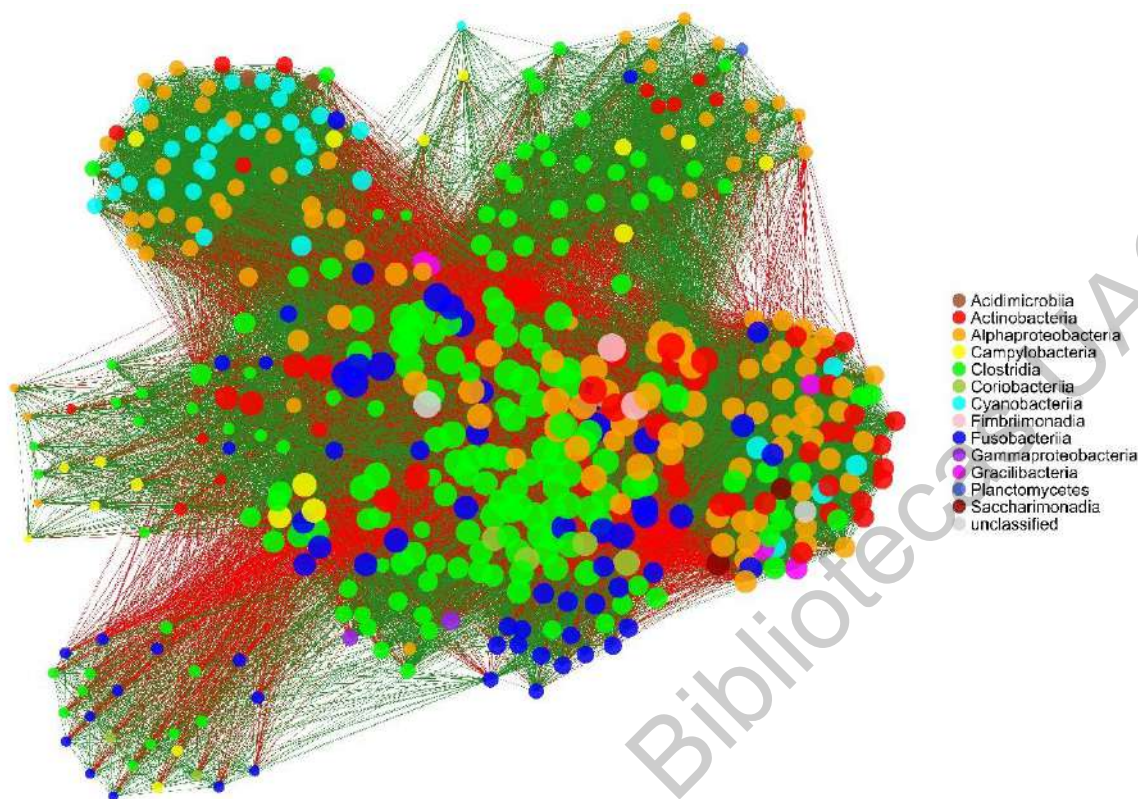


Figura 32. Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico de ZcPV-1 negativo. Cada punto representa un ASV, y el tamaño de cada uno está en función del *degree*. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo).

Cuadro 30. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico de ZcPV-1 negativo.

ASV	Clase	Género
ASV186	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium</i>
ASV190	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium</i>
ASV59	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cutibacterium</i>
ASV99	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>
ASV445	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
ASV89	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
ASV93	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
ASV49	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Porphyrobacter</i>
ASV52	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Porphyrobacter</i>
ASV130	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingobium</i>
ASV111	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>
ASV377	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerococcus</i>
ASV100	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV103	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV94	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>

Cuadro 30. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico de ZcPV-1 negativo (Continuación)

ASV	Clase	Género
ASV115	<i>Clostridia</i>	<i>Butyricoccus</i>
ASV120	<i>Clostridia</i>	<i>Butyricoccus</i>
ASV176	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
ASV341	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
ASV367	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
ASV36	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV40	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV28	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV32	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV6	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV8	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>
ASV38	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>
ASV41	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoniphilus</i>
ASV142	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV22	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV51	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV58	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV65	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcaceae W5053</i>
ASV75	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcaceae W5053</i>
ASV238	<i>Fimbriimonadia</i>	Sin clasificar
ASV255	<i>Fimbriimonadia</i>	Sin clasificar
ASV1	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV2	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV21	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV23	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV7	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV72	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV79	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV9	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV299	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV127	Sin clasificar	Sin clasificar

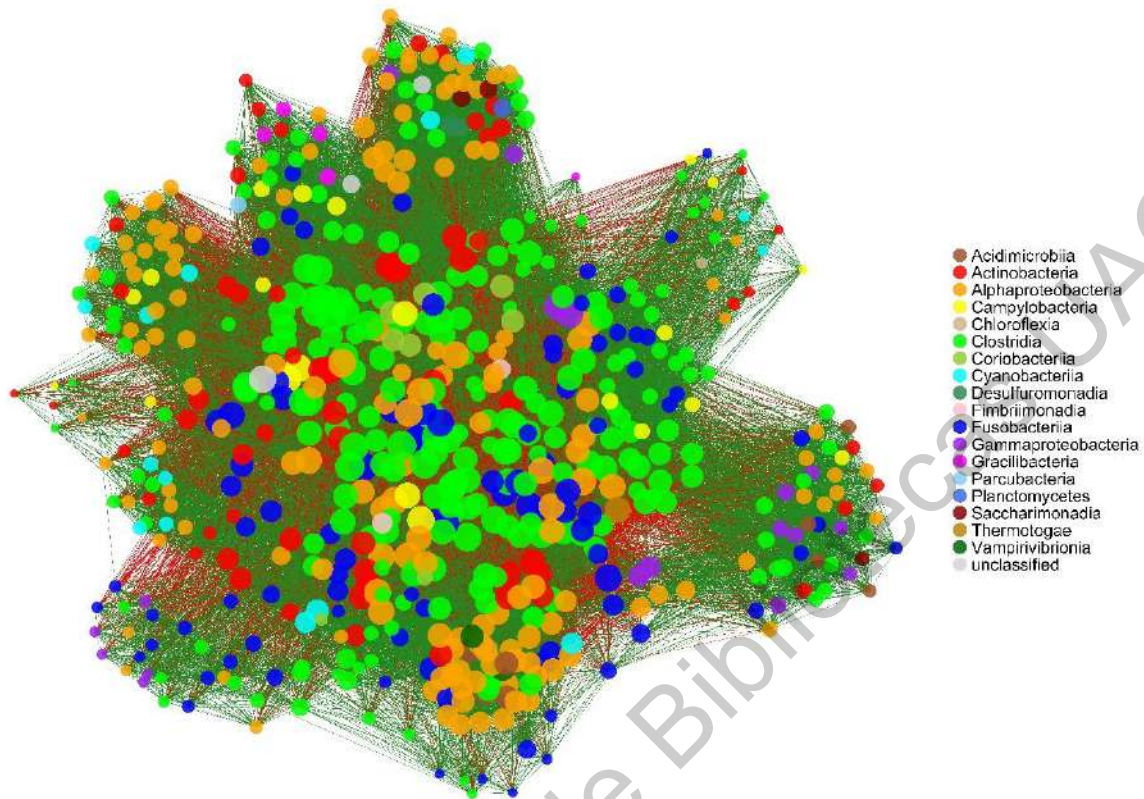


Figura 33. Red de co-ocurrencia bacteriana en muestras con diagnóstico de ZcPV-1 positivo. Cada punto representa un ASV, y el tamaño de cada uno esta en función del *degree*. El color de los bordes indica si la relación de co-ocurrencia es positiva (verde) o negativa (rojo).

Cuadro 31. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico de ZcPV-1 positivo.

ASV	Clase	Género
ASV24	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV25	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV292	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV303	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arcanobacterium</i>
ASV18	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium</i>
ASV20	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacterium</i>
ASV211	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>
ASV89	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
ASV93	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
ASV221	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>
ASV267	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacter</i>
ASV337	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacter</i>
ASV207	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Novosphingobium</i>

Cuadro 31. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico de ZcPV-1 positivo (Continuación).

ASV	Clase	Género
ASV224	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Novosphingobium</i>
ASV324	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pedomicrobium</i>
ASV366	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pedomicrobium</i>
ASV116	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Pseudahrensia</i>
ASV205	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>
ASV10	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>
ASV5	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacter</i>
ASV217	<i>Campylobacteria</i>	<i>Helicobacter</i>
ASV266	<i>Campylobacteria</i>	<i>Helicobacter</i>
ASV100	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV103	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV94	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV97	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i>
ASV115	<i>Clostridia</i>	<i>Butyricoccus</i>
ASV120	<i>Clostridia</i>	<i>Butyricoccus</i>
ASV42	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>
ASV45	<i>Clostridia</i>	<i>Colidextribacter</i>
ASV11	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>
ASV12	<i>Clostridia</i>	<i>Ezakiella</i>
ASV30	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>
ASV33	<i>Clostridia</i>	<i>Faecalibacterium</i>
ASV218	<i>Clostridia</i>	<i>Fastidiosipila</i>
ASV40	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV62	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV70	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV36	<i>Clostridia</i>	<i>Helcococcus</i>
ASV256	<i>Clostridia</i>	<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>
ASV251	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV28	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV32	<i>Clostridia</i>	<i>Lachnoclostridium</i>
ASV39	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>
ASV44	<i>Clostridia</i>	<i>Negativibacillus</i>
ASV54	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214</i>
ASV56	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillospiraceae NK4A214</i>
ASV95	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillibacter</i>
ASV98	<i>Clostridia</i>	<i>Oscillibacter</i>
ASV135	<i>Clostridia</i>	<i>Paraclostridium</i>
ASV196	<i>Clostridia</i>	<i>Peptoclostridium</i>

Cuadro 31. ASVs identificados como especies clave en muestras de hembras de *Zalophus californianus* con diagnóstico de ZcPV-1 positivo (Continuación)

ASV	Clase	Género
ASV225	<i>Clostridia</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
ASV114	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerovoracaceae S5-A14a</i>
ASV248	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UBA1819</i>
ASV106	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-002</i>
ASV131	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV133	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV193	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV22	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV43	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV46	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV51	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV53	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV55	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV58	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV87	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae UCG-005</i>
ASV136	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV31	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV34	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV47	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV48	<i>Clostridia</i>	Sin clasificar
ASV396	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV50	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV57	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacterium</i>
ASV149	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV154	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV3	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV4	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Oceanivirga</i>
ASV203	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Anaerobiospirillum</i>
ASV271	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Anaerobiospirillum</i>
ASV721	<i>Thermotogae</i>	<i>Fervidobacterium</i>
ASV127	Sin clasificar	Sin clasificar

CONCLUSIONES

Esta tesis constituye la primera descripción del microbioma bacteriano cervical del lobo marino de California. El microbioma núcleo está conformado principalmente por los géneros *Fusobacteriia*, *Clostridia* y *Actinobacteria* junto con una gran variedad de otras bacterias, algunas de las cuales ya habían sido detectadas en los microbiomas genitales de otras especies, mientras que otras son principalmente de origen ambiental.

Se encontró evidencia de cambios en la composición del microbioma en epitelios con transformación precancerosa (ASC, LSIL), estados de inflamación y en epitelios infectados con virus potencialmente oncogénicos. Dada la naturaleza de los datos no es posible identificar si los cambios observados en los estados inflamatorios y de transformación epitelial son causa o consecuencia de las variaciones en la composición del microbioma. Sin embargo, se han descrito varios mecanismos por los cuales algunas bacterias pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Fusobacterium* inducen la transformación y proliferación celular de epitelios de otras especies, y varios estudios ponen de manifiesto la relación entre el aumento en la abundancia de estas bacterias y el desarrollo de diversos tipos de cáncer. Fue en las hembras con inflamación epitelial donde los cambios en el microbioma incluyeron el aumento en la abundancia de varias especies con potencial oncogénico o proinflamatorio, aunque también se vieron cambios en otras bacterias que son consideradas patógenos oportunistas. Investigaciones recientes apuntan a la relación entre inflamación crónica y cáncer, por lo que estos cambios podrían representar un factor más para la presentación del carcinoma urogenital en el lobo marino de California.

Algunas de las bacterias que presentaron un incremento o disminución en su abundancia en función del estado del epitelio formaban parte del microbioma núcleo, lo que sugiere que, más que una relación causal directa con un solo organismo, son las interacciones entre miembros de la comunidad las que permiten que el microbioma pueda ser un elemento más de defensa ante otros carcinógenos,

o bien un factor de riesgo que favorezca la transformación epitelial.

El OthV-1 ha sido identificado como un factor en el desarrollo del cáncer urogenital, y se ha visto que la infección se produce desde edades tempranas. En este sentido, resultó interesante que *Cutibacterium acnes* y *Corynebacterium tuberculostearicum* estuvieran asociadas a la infección epitelial con este virus, ya que están relacionadas con efectos inflamatorios crónicos y posterior desarrollo de malignidad. Por otra parte, ZcPV1, virus que recientemente se asoció a la presencia de carcinoma de células escamosas en el lobo marino de California, no parece estar asociado a cambios en el microbioma relacionados con la transformación oncogénica, a pesar de que algunos de los cambios celulares detectados son típicos de una infección por *Papillomavirus*.

Cada vez son más los factores que se identifican como agentes de riesgo o promotores del carcinoma urogenital del lobo marino de California. Esta tesis representa un primer acercamiento al papel del microbioma en el desarrollo de esta patología. La información obtenida es relevante ya que hace patente que las comunidades bacterianas pueden ser grandes aliados en la defensa contra el cáncer, o por el contrario, convertirse en promotoras de la oncogénesis, y que esto depende no solo de las bacterias presentes, sino también de las relaciones entre ellas y con el hospedero.

BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard K., Ma J., Antony K. M., Ganu R., Petrosino J., Versalovic J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* 6(237): 237ra65.
- Abby S. S., Touchon M., De Jode A., Grimsley N., Piganeau G. 2014. Bacteria in *Ostreococcus tauri* cultures - friends, foes or hitchhikers?. *Front. Microbiol.* 5: 505.
- Abegglen L. M., Caulin A. F., Chan A., Lee K., Robinson R., Campbell M. S., Kiso W. K., Schmitt D. L., Waddell P. J., Bhaskara S., Jensen S. T., Maley C. C., Schiffman J. D. 2015. Potential Mechanisms for Cáncer Resistance in Elephants and Comparative Cellular Response to DNA Damage in Humans. *JAMA.* 314:1850.
- Acevedo-Whitehouse K., Gulland F., Greig D., Amos W. 2003. Disease susceptibility in California sea lions. *Nature* 422: 35.
- Adame K., Elorriaga-Verplancken F. R., Beier E. Acevedo-Whitehouse K., Pardo M. A. 2020. The demographic decline of a sea lion population followed multi-decadal sea surface warming. *Sci. Rep.* 10: 10499
- Afgan E., Baker D., Batut B., van den Beek M., Bouvier D., Čech M., Chilton J., Clements D., Coraor N., Grüning B., Guerler A., Hillman-Jackson J., Jalili V., Rasche H., Soranzo N., Goecks J., Taylor J., Nekrutenko A., Blankenberg D. 2018. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update *Nucleic Acids Res.* 46(W1): W537-W544.
- Alarcón C.T., D'Auria G., Delgado P. S., Del Campo M. R., Ferrer M. M. 2016. Microbiota. 59. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Consultado 20 de abril de 2019. Disponible: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia59.pdf>.
- Alarcón P., González M., Castro E. 2016. Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Rev. Med. Chile.* 144: 910-916.

- Aldunate M., Srbinovski D., Hearps A. C., Latham C. F., Ramsland P. A., Gugasyan R., Cone R. A., Tachedjian G. 2015. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front. Physiol.* 6: 164.
- Alonso T., Morales-González M. J. 1994. Oncogenes: Aspectos básicos de interés para la clínica nefrológica y urológica. *Nefrología.* 14(2): 163-174.
- Altonsy M. O., Kurwa H. A., Lauzon G. J., Amrein M., Gerber A. N., Almishri W., Mydlarski P. R. 2020. *Corynebacterium tuberculostearicum*, a human skin colonizer, induces the canonical nuclear factor- κ B inflammatory signaling pathway in human skin cells. *Immun. Inflamm. Dis.* 8: 62-79.
- Álvarez-Calatayud G., Suárez E., Rodríguez J. M., Pérez-Moreno J. 2015. La microbiota en la mujer; aplicaciones clínicas de los probióticos. *Nutr. Hosp.* 32(Supl. 1): 56-61.
- Aktipis, C. A., Boddy A. M., Jansen G., Hibner U., Hochberg M. E., Maley C. C., Wilkinson G. S. 2015. Cáncer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 370: 20140219-20140219.
- Audirac-Chalifour A., Torres-Poveda K., Bahena-Román M., Téllez-Sosa J, Martínez-Barnetche J., Cortina-Ceballos B., López-Estrada G., Delgado-Romero K., Burguete-García A. I., Cantú D., García-Carrancá A., Madrid-Marina V. 2016. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cáncer: A Pilot Study. *PLoS One.* 11(4): e0153274.
- Aurioles-Gamboa D., Zavala-González A. 1994. Algunos factores ecologicos que determinan la distribucion y abundancia del lobo marino *Zalophus californianus*, en el golfo de California. *Cienc. Mar.* 20(4): 535-553.
- Balmer M. L., Schürch C. M., Saito Y., Geuking M. B., Li H., Cuenca M. A., Kovtonyuk L. V., McCoy K. D., Hapfelmeier S., Ochsenbein A. F., Manz M. G., Slack E., Macpherson A. J. 2014. Microbiota-derived compounds drive steady-state granulopoiesis via MyD88/TICAM signaling. *J. Immunol.* 193

(10): 5273-5283

Barragán-Vargas C. 2013. Anormalidades celulares y prevalencia de OthV-1 y estreptococos beta-hemolíticos en tejido genital de lobos marinos de California (*Zalophus californianus*) en la región de las grandes islas del Golfo de California, México [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Barragán-Vargas C. 2015. Transformación celular epitelial y apoptosis: Un marco ecológico y molecular para el lobo marino de California [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Barragán-Vargas C., Montano-Frías J., Ávila R. G., Godínez-Reyes C. R., Acevedo-Whitehouse K. 2016. Transformation of the genital epithelial tract occurs early in California sea lion development. R. Soc. Open Sci. 3: 150419.

Belkaid Y., Hand T. W. 2014. Role of the microbiota in immunity and inflammation. Cell. 157(1): 121-141.

Belkaid Y., Harrison O. J. 2017. Homeostatic immunity and the microbiota. Immunity. 46(4): 562-576.

Bhatt A. P., Redinbo M. R., Bultman S. J., 2017. The role of the microbiome in cáncer development and therapy. Ca. Cáncer J. Clin. 67: 326-344.

Bik E. M., Costello E. K., Switzer A. D., Callahan B. J., Holmes S. P., Wells R. S., Carlin K. P., Jensen E. D., Venn-Watson S., Relman D. A. 2016. Marine mammals harbor unique microbiotas shaped by and yet distinct from the sea. Nat. Commun. 7: 10516.

Bilen M., Mbogning M. D., Cadoret F., Dubourg G., Daoud Z., Fournier P. E., Raoult D. 2017. "*Pygmaibacter massiliensis*" sp. nov., a new bacterium isolated from the human gut of a Pygmy woman. New Microbe New Infect. 16: 37-38.

Bouvard V., Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Freeman C., Galichet L., Coglianò V. 2009. A review of human carcinogens – Part B: biological agents. Lancet Oncol. 10(4): 321-

- Bowen L., Aldridge B. M., Gulland F., Van Bonn W., DeLong R., Melin S., Lowenstine L. J., Stott J. L., Johnson M. L. 2004. Class II multiformity generated by variable MHC-DRB region configurations in the California sea lion (*Zalophus californianus*). Immunogenetics. 56:12–27.
- Bowen L., Aldridge B. M., DeLong R., Melin S., Buckles E. L., Gulland F., Lowenstine L. J., Stott J. L., Johnson M. L. 2005. An immunogenetic basis for the high prevalence of urogenital cancer in a free-ranging population of California sea lions (*Zalophus californianus*). Immunogenetics 56: 846-848.
- Brown K., Church D., Lynch T., Gregson D. 2014. Bloodstream infections due to *Peptoniphilus spp.*: report of 15 cases. Clin. Microbiol. Infect. 20(11): O857–O860.
- Browning H. M., Acevedo-Whitehouse K., Gulland F. M. D., Hall A. J., Finlayson J., Dagleish P., Billington K. J., Colegrove K., Hammond J. A. 2014. Evidence for a genetic basis of urogenital carcinoma in the wild California sea lion. Proc. R. Soc. B 281:20140240.
- Browning H. M., Gulland F. M. D., Hammond J. A., Colegrove K. M., Hall A. J. 2015. Common cancer in a wild animal: the California sea lion (*Zalophus californianus*) as an emerging model for carcinogenesis. Phil. Trans. R. Soc. B 370: 20140228.
- Buckles E. L., Lowenstine L. J., DeLong R. L., Melin S. R., Vittore R. K., Wong H. N., Ross G. L., St. Leger J. A., Greig D. J., Duerr R. S., Gulland F. M. D., Stott J. L. 2007. Age-prevalence of Otarine Herpesvirus-1, a tumor-associated virus, and possibility of its sexual transmission in California sea lions. Vet. Microbiol. 120: 1-8.
- Buckles E. L., Lowenstine L. J., Funke C., Vittore R. K., Wong H. N., St. Leger J. A., Greig D. J., Duerr R. S., Gulland F. M. D., Stott J. L. 2006. Otarine Herpesvirus-1, not Papillomavirus, is associated with endemic tumours in California sea lions (*Zalophus californianus*). J. Comp. Path. 135: 183-189.

Callahan B. J., McMurdie P. J., Holmes S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 11: 2639-2643.

Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., Holmes S. P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.* 13: 581-583.

Castro-Nallar E., Gutzwiller F., Mendez K. N. 2019. Curso pre-congreso ISME Latin America 2019: Análisis de datos bioinformáticos para metagenomas y amplicones usando R. Consultado: 5 de agosto de 2019. Disponible: http://castrolab.org/isme/bienvenida_WorkshopISME.html.

Cato E. P., Moore W. E. C., Holdeman L. V. 1968. *Clostridium oroticum* comb. nov. amended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 17(1): 9-13.

Chander A. M., Nair R. G., Kaur G., Kochhar R., Dhawan D. K., Bhadada S. K., Mayilraj S. 2017. Genome insight and comparative pathogenomic analysis of *Nesterenkonia jeotgali* strain CD08_7 isolated from duodenal mucosa of celiac disease patient. *Front. Microbiol.* 8: 129.

Chang C. Y., Chen W. T., Haga T., Yamashita N., Lee C. F., Tsuzuki M., Chang H. W. 2020. The Detection and Association of Canine Papillomavirus with Benign and Malignant Skin Lesions in Dogs. *Viruses.* 12(2): 170.

Chen C., Song X., Wei W., Zhong H., Dai J., Lan Z., Li F., Yu X., Feng Q., Wang Z., Xie H., Chen X., Zeng C., Wen B., Zeng L., Du H., Tang H., Xu C., Xia Y., Xia H., Yang H., Wang J., Wang J., Madsen L., Brix S., Kristiansen K., Xu X., Li J., Wu R., Jia H. 2017. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat. Commun.* 8: 875.

Cheng Y., Fox S., Pemberton D., Hogg C., Papenfuss A. T., Belov K. 2015. The Tasmanian devil microbiome—implications for conservation and management. *Microbiome* 3: 76.

Chow S. K., Clarridge J. E. III. 2014. Identification and clinical significance of

Helcococcus species, with description of *Helcococcus seattlensis* sp. nov. from a patient with urosepsis. J. Clin. Microbiol. 52(3): 854–858.

Chu D. M., Ma J., Prince A. L., Antony K. M., Seferovic M. D., Aagaard K. M. 2017. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. Nat. Med. 23(3): 314-326.

Cointe A., de Ponfilly G. P., Munier A. L., Bachir M., Benmansour H., Crémieux A. C., Forien M., Frazier A., Krief E., Cambau E., Jacquier H. 2019. Native joint septic arthritis due to *Clostridium tarantellae*. Anaerobe. 56: 46-48

Colegrove K. M., Gulland F. M. D., Naydan D. K., Lowenstine L. J. 2009a. Tumor morphology and immunohistochemical expression of estrogen receptor, progesterone receptors, p53 and Ki67 in urogenital carcinoma of California sea lions (*Zalophus californianus*). Vet. Pathol. 46: 642-655.

Colegrove K. M., Gulland F. M. D., Naydan D. K., Lowenstine L. J. 2009b. Normal morphology and hormone receptor expression in the male California sea lion (*Zalophus californianus*) genital tract. Anat. Rec. 292: 1818-1826.

Colegrove K. M., Gulland F. M. D., Naydan D. K., Lowenstine L. J. 2009c. The normal genital tract of the female California sea lion (*Zalophus californianus*): Cyclic changes in histomorphology and hormone receptor distribution. Anat. Rec. 292: 1801-1817.

Cooper G. M. 2000. The Cell: A Molecular Approach. 2a edición. Sinauer Associates. Sunderland, MA.

Courtman N.F. 2016. Septic peritonitis in a dog caused by *Anaerobiospirillum succiniproducens*. Vet. Clin. Pathol. 45: 352-355.

Dagleish M. P., Barrows M., Maley M., Killick R., Finlayson J., Goodchild R., Valentine A., Saunders R., Willoughby K., Smith K. C., Stidworthy M. F. 2013. The first report of otarine herpesvirus-1-associated urogenital carcinoma in a South American fur seal (*Arctocephalus australis*). J. Comp. Pathol. 49(1):119-25.

- Dang C. V. 2015. A metabolic perspective of Peto's paradox and cáncer. Phil. Trans. R. Soc. B. 370: 20140223.
- De Carvalho A. C., de Mattos P. L., Datorre J. G., dos Santos W., Berardinelli G. N., Matsushita M. M., Oliveira M. A., Durães R. O., Guimarães D. P., Reis R. M. 2019. Microbiota profile and impact of *Fusobacterium nucleatum* in colorrectal cáncer patients of Barretos Cáncer Hospital. Front. Oncol. 9: 813.
- De Cock H. E., Marks S. L., Stacy B. A., Zabka T. S., Burkitt J., Lu G., Steffen D. J., Duhamel G. E. 2004. Ileocolitis associated with *Anaerobiospirillum* in cats. J. Clin. Microbiol. 42(6): 2752-2758.
- Del Toro L., Heckel G., Camacho-Ibar V. F., Schramm Y. 2006. California sea lions (*Zalophus californianus californianus*) have lower chlorinated hydrocarbon contents in northern Baja California, México, than in California, USA. Environ. Pollut. 142(1):83-92.
- D'Miranda A. D. 2013. Vaginal microbial flora of normal and infertile bitches [Tesis de maestría]. Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University. Bidar, India.
- Deming A. C., Colegrove K. M., Duignan P. J., Hall A. J., Wellehan J. F. X., Gulland F. M. D. 2018. Prevalence of urogenital carcinoma in stranded California sea lions (*Zalophus californianus*) from 2005-2015. J. Wildlife Dis. 54(3): 581-586.
- Dierauf L. A., Gulland F. M. D. 2001. CRC Handbook of marine mammal medicine. 2ª edición. CRC Press. Boca Raton, FL.
- DiGiulio D.B., Romero R., Amogan H. P., Kusanovic J. P., Bik E. M., Gotsch F., Kim C. J., Erez O., Edwin S., Relman D. A. 2008. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. PLoS One. 26;3 (8): e3056.
- Dobson J. M., Lascelles B. D. X. (Ed.). 2014. Manual de oncología en pequeños animales. 3ª edición. Ediciones S. Barcelona, España.
- Ducasse H., Ujvari B., Solary E., Vittecoq M., Arnal A., Bernex F., Pirot N., Misse D.,

- Bonhomme F., Renaud F., Thomas F., Roche B. 2015. Can Peto's paradox be used as the null hypothesis to identify the role of evolution in natural resistance to cancer? A critical review. *BMC Cáncer*. 15.
- Eisenberg T., Kämpfer P., Ewers C., Semmler T., Glaeser S. P., Collins E., Ruttledge M., Palmer R. 2016. *Oceanivirga salmonicida* gen. nov., sp. nov., a member of the *Leptotrichiaceae* isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 66: 2429 – 2437.
- Elorriaga-Verplancken F. R., Ferretto G. Angell O. C., Harris C. 2015. Estado actual del lobo marino de California (*Zalophus californianus*) y el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) en el archipiélago San Benito, México. *Cienc. Mar.* 41(4): 269-281.
- Ertl R., Korb M., Langbein-Detsch I., Klein D. 2015. Prevalence and risk factors of gammaherpesvirus infection in domestic cats in Central Europe. *Viol. J.* 12: 146.
- Eslami-S Z., Majidzadeh-A K., Halvaei S., Babapirali F., Esmaeili R. Microbiome and breast cancer: New role for an ancient population. *Front. Oncol.* 10: 120.
- Ewald P. W., Swain E. H. A. 2015. Infection and cancer in multicellular organisms. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 370:20140224.
- Ezaki T., Kawamura Y., Li N., Li Z. Y., Zhao L., Shu S. 2001. Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 51(4): 1521-1528.
- Farrow J. A., Lawson P. A., Hippe H., Gauglitz U., Collins M. D. 1995. Phylogenetic evidence that the gram-negative nonsporulating bacterium *Tissierella* (*Bacteroides*) *praeacuta* is a member of the *Clostridium* subphylum of the gram-positive bacteria and description of *Tissierella creatinini* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(3): 436-440.
- Feng P., Moses A., Früh K. 2013. Evasion of adaptive and innate immune response mechanisms by γ -herpesviruses. *Curr. Opin. Virol.* 3(3): 285-295.

- Fernández P. J., Bernet V. E. 2002. Receptores hormonales en cáncer de mama. Rev. Senología y Patol. Mam. 15 (3): 115-22.
- Ferreira-Halder C. V., de Sousa F. A. V., Siqueira A. S. 2017. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease. Best. Pract. Res. Cl. Ga. 31(6): 643-648.
- García C. R., Luna-Heredia E., Olid-Velilla M., Vazquez-Gomez O. 2016. Bacteraemia due to *Parvimonas micra*, a commensal pathogen, in a patient with an oesophageal tumour. BMJ Case Rep. 2016:bcr2016217740.
- Garrett W. S. 2015. Cáncer and the microbiota. Science. 348(6230): 80-86.
- Gérard P. 2014. Metabolism of Cholesterol and Bile Acids by the Gut Microbiota. Pathogens. 3: 14-24.
- Gholizadeha P., Eslamib H., Yousefic M., Asgharzadehd M., Aghazadehe M., Kafil H. S. 2016. Role of oral microbiome on oral cáncers, a review. Biomed. Pharmacother. 84: 552-558.
- Gibbons S. M., Gilbert J. A. 2015. Microbial diversity – Exploration of natural ecosystems and microbiomes. Curr. Opin. Genet. Dev. 35: 66-72.
- Gómez A. J. A. 2008. Ecología de los ensamblajes de larvas de odonatos (*Insecta*) y su uso potencial como indicadores de calidad ecológica en la Sierra de Coalcomán, Michoacán, México [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México.
- Granados G. M., Arrieta R. O., Cantú L. D. 2013. Oncología y cirugía: Bases y principios. 1ª edición. El Manual Moderno. México, D. F.
- Greig D. J., Ylitalo G. M., Hall A. J., Fauquier D. A., Gulland F. M. D. 2007. Transplacental transfer of organochlorines in California sea lions (*Zalophus californianus*). Environ. Toxicol. Chem. 26(1): 37-44.
- Gross E. L., Leys E. J., Gasparovich S. R., Firestone N. D., Schwartzbaum J. A., Janies D. A., Asnani K., Griffen A. L. 2010. Bacterial 16S Sequence Analysis of Severe Caries in Young Permanent Teeth. J. Clin. Microbiol. 48 (11):

4121-4128.

Guarner F. 2007. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nut. Hosp.* 22 (Supl. 2): 14-19.

Guarner F. 2011. Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. *Gastroenterol. Hepatol.* 34(3): 147-154.

Guarner F., Malagelada J. R. 2003. La flora bacteriana del tracto digestivo. *Gastroenterol. Hepatol.* 26(Supl. 1): 1-5.

Guijon F., Paraskevas M., Rand F., Heywood E., Brunham R., McNicol P. 1992. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 37(3): 185-91.

Gulland F. M. D., Trupkiewicz J. G., Spraker T. R., Lowenstine L. J. 1996. Metastatic carcinoma of probable transitional cell origin in 66 free-living California sea lions (*Zalophus californianus*), 1979 to 1994. *J. Wildlife Dis.* 32(2): 250-258.

Hanahan, D., Weinberg. R. A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 144: 646-674.

Harms C., Schleicher A., Collins M. D., Andreesen J. R. 1998. *Tissierella creatinophila* sp. nov., a Gram-positive, anaerobic, non-spore-forming, creatinine-fermenting organism. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 48: 983 – 993.

Hashemi Goradel N., Heidarzadeh S., Jahangiri S., Farhood B., Mortezaee K., Khanlarkhani N., Negahdar, B. 2018. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A mechanistic overview. *J. Cell. Physiol.* 234(3): 2337-2344.

He Z., Gharaibeh R. Z., Newsome R. C., Pope J. L., Dougherty, M. W., Tomkovich S., Pons B., Mirey G., Vignard J., Hendrixson D. R., Jobin C. 2019. *Campylobacter jejuni* promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin. *Gut.* 68: 289-300.

Heath C. B., Perrin W. F. 2008. California, Galapagos, and Japanese Sea Lions. *Zalophus californianus*, *Z. wollebaeki*, and *Z. japonicus*. En Perrin W. F.,

- Würsig B., Thewissen J.G.M. 2008. Encyclopedia of Marine Mammals (pp 170-176). 2a edición. Elsevier.
- Hedblom G. A., Reiland H. A., Sylte M. J., Johnson T. J., Baumler D. J. 2018. Segmented filamentous bacteria - Metabolism meets immunity. *Front. Microbiol.* 9: 1991.
- Hernanz-Lozón A., Sánchez-Pascual M., Muñoz-Arberas L., Carrera-Puerta A., Cisterna-Cáncer R., Andía-Ortiz D. 2017. Relación entre la infección por el virus del papiloma humano y *Chlamydia trachomatis*. *Clin. Invest. Gin.* 44(4): 167-173.
- Higgins R. 2000. Bacteria and fungi of marine mammals: A review. *Can. Vet. J.* 41: 105-116.
- Hijazin M., Sammra O., Ülbegi-Mohyla H., Nagib S., Alber J., Lämmler C., Kämpfer 2, Stefanie P. Glaeser², Hans-Jürgen Busse³, Johannes Kassmannhuber³, P., Prenger-Berninghoff E., Weiss R., Siebert U., Hassan A. A., Abdulmawjood A., Zschöck M. 2013. *Arcanobacterium phocisimile* sp. nov., isolated from harbour seals. *Int. J. Sys. Evol. Micr.* 63(6): 2019-2024.
- Holland S. M. 2008. Non-metric multidimensional scaling (MDS). Consultado 22 de mayo de 2019. Disponible: <https://strata.uga.edu/software/pdf/mdsTutorial.pdf>.
- Hsieh Y. Y., Tung S. Y., Pan H. Y., Yen C. W., Xu H. W., Lin Y. J., Deng Y. F., Hsu W. T., Wu C. S., Li C. 2018. Increased abundance of *Clostridium* and *Fusobacterium* in gastric microbiota of patients with gastric cancer in Taiwan. *Sci. Rep.* 8: 158.
- Im W. T., Hu Z. Y., Kim K. H., Rhee S. K., Meng H., Lee S. T., Quan Z. X. 2012. Description of *Fimbriimonas ginsengisoli* gen. nov., sp. nov. within the *Fimbriimonadia* class nov., of the phylum *Armatimonadetes*. *A. Van Leeuw.* 102: 307-317.
- Iraola G., Pe rez R., Naya H., Paolicchi F., Pastor E., Valenzuela S., Calleros L., Velilla A., Hernández., Morsella C. 2014. Genomic evidence for the

emergence and evolution of pathogenicity and niche preferences in the genus *Campylobacter*. *Genome Biol. Evol.* 6 (9): 2392-2405.

Iwamura C., Bouladoux N., Belkaid Y., Sher A., Jankovic D. 2017. Sensing of the microbiota by NOD1 in mesenchymal stromal cells regulates murine hematopoiesis. *Blood* 129 (2): 171-176.

Johnson S. P., Jang S., Gulland F. M. D., Miller M. A., Casper D. R., Lawrence J., Herrera J. 2003. Characterization and clinical manifestations of *Arcanobacterium phocae* infections in marine mammals stranded along the central California coast. *J. Wildlife Dis.* 39(1): 136-144.

Johnson S., Lowenstine L. J., Gulland F. M. D., Jang S., Imai D., Almy D., DeLong R., Gardner I. 2006. Aerobic bacterial flora of the vagina and prepuce of California sea lion (*Zalophus californianus*) and investigation of association with urogenital carcinoma. *Vet. Microbiol.* 114(1-2):94-103.

Jost L. 2019. Wat do we mean by diversity? The path towards quantification. *Mètode Sci. Stud. J.* 9: 55-61.

Jung Y. T., Park S., Lee J. S., Oh T. K., Yoon J. H. 2012. *Pseudahrensia aquimaris* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater. *Int. J. Sys. Evol. Micr.* 62(9): 2056-2061.

Jutinico-Shubach A. P., González-Devia J. L., Sánchez-Mora R. L. 2017. Asociación de HSP60 de *Chlamydia trachomatis* y desarrollo de cáncer de ovario. *NOVA.* 15(28): 57-68.

Kandlikar G. S., Gold Z. J., Cowen M. C., Meyer R. S., Freise A. C., Kraft N., Moberg-Parker J., Sprague J., Kushner D. J., Curd E. E. 2018. ranacapa: An R package and Shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and interactive visualizations. *F1000Res.* 7: 1734.

Kim B. H., Ramanan R., Cho D. H., Oh H. M., Kim H. S. 2014. Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass Bioenerg.* 69, 95-105.

Kim D. J., Yang J., Seo H., Lee W. H., Ho Lee D., Kym S., Park Y. S., Kim J. G.,

- Jang I. J., Kim Y. K., Cho J. Y. 2010. Colorectal cancer diagnostic model utilizing metagenomic and metabolomic data of stool microbial extracellular vesicles. *Sci. Rep.* 10(1): 2860.
- Kim H. S., Kim P. S., Hyun D. W., Lee J. Y., Kang W., Shin N. R., Whon T. W., Bae J. W. 2016. *Pseudahrensia todarodis* sp. nov., isolated from the gut of a Japanese flying squid, *Todarodes pacificus*. *Int. J. Sys. Evol. Micr.* 66(3): 1389-1393.
- Kindt R., Coe R. 2005. Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. World Agroforestry Centre (ICRAF). Nairobi, Kenya.
- King D. P., Hure M. C., Goldstein T., Aldrige B. M., Gulland F. M. D., Saliki J. T., Buckles E. L., Lowenstine L. J., Stott J. L. 2002. Otarine herpesvirus-1: a novel gammaherpesvirus associated with urogenital carcinoma in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Microbiol.* 86(1-2):131-137.
- Kitahara M., Takamine F., Imamura T., Benno Y. 2001. *Clostridium hiranonis* sp. nov., a human intestinal bacterium with bile acid 7 α -dehydroxylating activity. *Int. J. Sys. Evol. Micr.* 51: 39-44.
- Khan, M. S., Ishaq, M., Hinson, M., Potugari, B., & Rehman, A. U. 2019. *Parvimonas micra* bacteremia in a patient with colonic carcinoma. *Caspian J. Intern. Med.* 10(4): 472-475.
- Klein C., González D., Samwel K., Kahesa C., Mwaeselage J., Aluthge N., Fernando S., West J. T., Charles Wood C., Angeletti P. C. 2019. Relationship between the cervical microbiome, HIV status, and precancerous lesions. *mBio.* 10 (1): e02785-18.
- Knoll, A. H. 2011. The Multiple Origins of Complex Multicellularity. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 39: 217-239.
- Kobayashi Y., Okuda N., Matsumoto M., Inoue K., Wakita M., Hoshino S., 1998. Constitutive expression of a heterologous *Eubacterium ruminantium* xylanase gene (*xynA*) in *Butyrivibrio fibrisolvens*, *FEMS Microbiol. Lett.*

163(1): 11-17.

Kokko H., Hochberg M. E. 2015. Towards cancer-aware life-history modelling. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 370:20140234.

Kostic A. D., Gevers D., Pedamallu C. S., Michaud M., Duke F., Earl A. M., Ojesina A. I., Jung J., Bass A. J., Tabernero J., Baselga J., Liu C., Shivdasani R. A., Ogino S., Birren B. W., Huttenhower C., Garrett W. S., Meyerson M. 2012. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 22(2): 292-298.

Kurtz Z., Mueller C., Miraldi E., Bonneau R. 2020. SpiecEasi: Sparse inverse covariance for ecological statistical inference. R package version 1.0.7.

Kwasniewski W., Wolun-Cholewa M., Kotarski J., Warchol W., Kuzma D., Kwasniewska A., Gozdzicka-Jozefiak A. 2018. Microbiota dysbiosis is associated with HPV-induced cervical carcinogenesis. *Oncol Lett.* 16: 7035-7047.

Lahti L., Shetty S. 2018. Introduction to the microbiome R package. Consultado: 22 de abril de 2019. Disponible: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/microbiome/inst/doc/vignette.html>.

Lai C. C., Cheng A., Liu W. L., Tan C. K., Huang Y. T., Chung K. P., Lee M. R., Hsueh P. R. 2011. Infections caused by unusual *Methylobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 49(9): 3329-3331.

Laniewsky P., Barnes D., Goulder A., Cui H., Roe D. J., Chase D. M., Herbst-Kralovets M. M. 2018. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women. *Sci Rep-UK.* 8:7593.

Lawson P. A., Rainey F. A. 2016. Proposal to restrict the genus *Clostridium* Prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 66: 1009-1016.

Layeghifard M., Hwang D. M., Guttman D. S. 2018. Constructing and analyzing

microbiome networks in R. *Methods Mol. Biol.* 1849: 243-266.

Le Boeuf B. J., Giesy J. P., Kannan K., Kajiwara N., Tanabe S., Debier C. 2002. Organochloride pesticides in California sea lions revisited. *BMC Ecol.* 2: 11.

Le Chatelier E., Nielsen T., Qin J., Prifti E., Hildebrand F., Falony G., Almeida M., Arumugam M., Batto J. M., Kennedy S., Leonard P., Li J., Burgdorf K., Grarup N., Jørgensen T., Brandslund I., Nielsen, H. B., Juncker A. S., Bertalan M., Levenez F., Pons N., Rasmussen S., Sunagawa S., Tap J., Tims S., Zoetendal E. G., Brunak S., Clément K., Doré J., Kleerebezem M., Kristiansen K., Renault P., Sicheritz-Ponten T., de Vos W. M., Zucker J. D., Raes J., Hansen T., Guedon E., Delorme C., Layec S., Khaci G., van de Guchte M., Vandemeulebrouck G., Jamet A., Dervyn R., Sanchez N., Maguin E., Haimet F., Winogradski Y., Cultrone A., Leclerc M., Juste C., Blottière H., Pelletier E., LePaslier D., Artiguenave F., Bruls T., Weissenbach J., Turner K., Parkhill J., Antolin M., Manichanh C., Casellas F., Boruel N., Varela E., Torrejon A., Guarner F., Denariáz G., Derrien M., van Hylckama Vlieg J. E. T., Veiga P., Oozeer R., Knol J., Rescigno M., Brechot C., M'Rini C., Mérieux A., Yamada T., Bork P., Wang J., Ehrlich S. D., Pedersen O., MetaHIT consortium. 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 500: 541-546.

LeVier K., Phillips R. W., Grippe V. K., Roop II R. M., Walker G. C. 2000. Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science*, 287(5462): 2492-2493.

Lewis F. M. T., Bernstein K. T., Aral S. O. 2017. El microbioma vaginal y su relación con el comportamiento, la salud sexual y las enfermedades de transmisión sexual. *Obstet. Gynecol.* 129: 643-654.

Lipscomb T. P., Scott D. P., Garber R. L., Krafft A. E., Tsai M. M., Lichy J. H., Taubenberger J. K., Schulman F. Y., Gulland F. M. D. 2000. Common metastatic carcinoma of California sea lions (*Zalophus californianus*): Evidence of genital origin and association with novel gammaherpesvirus. *Vet. Pathol.* 37: 609-617.

- Liu K., Zong R., Li Q., Fu Y., Xu Y., Wang Y., Jiao N. 2012. *Oceaniovalibus guishaninsula* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family *Rhodobacteraceae*. *Curr. Microbiol.* 64, 385-391.
- Liu Y., Wang R. P., Ren C., Lai Q. L., Zeng R. Y. 2015. *Rhizobium marinum* sp. nov., a malachite-green-tolerant bacterium isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(12): 4449-4454.
- Lopez A. B., Irigoyen S. A., Sáez N. J. A., Beltran R. A. 2017. First report of human infection by *Christensenella minuta*, a gram-negative, strictly anaerobic rod that inhabits the human intestine. 44: 124-125.
- Love M. I., Huber W., Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15: 550
- Luff J. A., Burns R. E., Mader M., Priest K. D., Tuttle A. D. 2018. Cutaneous squamous cell carcinoma associated with *Zalophus californianus* papillomavirus 1 in a California sea lion. *J. Vet. Diagn. Invest.* 30(4): 572-575.
- Lyman C. C., Holyoak G. R., Meinkoth K., Wieneke X., Chillemi K. A., DeSilva U. 2019. Canine endometrial and vaginal microbiomes reveal distinct and complex ecosystems. *PLoS ONE* 14(1): e0210157.
- Lynch M., Neufeld J. 2015. Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 13: 217-229.
- Mancabelli L., Milani C., Lugli G. A., Turrone F., Cocconi D., van Sinderen D., Ventura M. 2017. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93(12): fix153.
- Martín R., Soberón N., Vázquez F., Suárez J. E. 2008. La microbiota vaginal: Composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26(3): 160-167.
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 17(1): 10-12.

- Mathieu E., Escribano-Vázquez U., Descamps D., Cherbuy C., Langella P., Riffault S., Remot A., Thomas M. 2018. Paradigms of lung microbiota functions in health and disease, particularly, in asthma. *Front. Physiol.* 9: 1168.
- McAloose D., Newton A. L. 2009. Wildlife cáncer: a conservation perspective. *Nat. Rev. Cáncer.* 9: 517-526.
- McMurdie P. J., Holmes S. 2013. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE.* 8(4), e61217.
- Medina V. E. A., Martínez M. R. (Ed.). 2009. Fundamentos de oncología. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México, D. F.
- Michel A. R. J., Izeta G. A. C., Torres A. G., Michel I. A. C. M. 2017. La microbiota y el microbioma intestinal. (Entre las llaves del reino y una nueva caja de Pandora). *Rev. Sanid. Milit. Mex.* 71(5): 443-448.
- Miller E. A., Beasley D. E., Dunn R. R., Archie E. A. 2016. Lactobacilli dominance and vaginal pH: Why Is the human vaginal microbiome unique? *Front. Microbiol.* 7: 1936.
- Mitsuhashi K., Nosho K., Sukawa Y., Matsunaga Y., Ito M., Kurihara H., Kanno S., Igarashi H., Naito T., Adachi Y., Tachibana M., Tanuma T., Maguchi H., Shinohara T., Hasegawa T., Imamura M., Kimura Y., Hirata K., Maruyama R., Suzuki H., Imai K., Yamamoto H., Shinomura Y. 2015. Association of *Fusobacterium* species in pancreatic cáncer tissues with molecular features and prognosis. *Oncotarget.* 6(9): 7209-7220.
- Morris, W. E., Fernández-Miyakawa, M. E. 2009. Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Rev. Argent. Microbiol.* 41(4): 251-260.
- Mosca A., Leclerc M., Hugot J. P. 2016. Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem?. *Front. Microbiol.* 7: 455.
- Murphy E. C., Frick I. M. 2013 Gram-positive anaerobic cocci-- Commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 37(4): 520–553.

- Mushegian A. A., Arbore R., Walser J.-C., Ebert D.. 2019. Environmental sources of bacteria and genetic variation in behavior influence host-associated microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 85: e01547-18.
- Nakashima C., Yamamoto K., Kishi S., Sasaki T., Ohmori H., Fujiwara-Tani R., Mori S., Kawahara I., Nishiguchi Y., Mori T., Kondoh M., Luo Y., Kirita T., Kuniyasu H. 2020. *Clostridium perfringens* enterotoxin induces claudin-4 to activate YAP in oral squamous cell carcinomas. *Oncotarget* 11: 309-321.
- Nayar R., Wilbur D. C. 2015. The Bethesda system for reporting cervical cytology. 3ª edición, Springer. Suiza.
- Neuendorf E., Gajer P., Bowlin A. K., Marques P. X., Ma B., Yang H., Fu L., Humphrys M. S., Forney L. J., Myers G. S. A., Bavoil P. M., Rank R. G., Ravel J. 2015. *Pathog. Dis.* 73(4): ftv019.
- Ni K., Wang Y., Li D., Cai Y., Pang H. 2015. Characterization, identification and application of lactic acid bacteria isolated from forage paddy rice silage. *PLoS ONE* 10(3): e0121967
- Niklas K. J., Newman S. A. 2013. The origins of multicelular organisms. *Evol. Dev.* 15: 41-52
- Niño-Torres C. A., Gardner S. C., Zenteno-Savín T., Ylitalo G. M. 2009. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in California sea lions (*Zalophus californianus californianus*) from the gulf of California, México. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 350-359.
- Noguchi K., Tsukumi K., Udono T., Urano T. 2004. Normal vaginal flora in chimpanzees (*Pan troglodytes*): qualitative and quantitative study. *Comp. Med.* 54(6): 705-12.
- Nugeyre M. T., Tchitchek N., Adapen C., Cannou C., Contreras V., Benjelloun F., Ravel J., Le Grand R., Marlin R., Menu E. 2019. Dynamics of vaginal and rectal microbiota over several menstrual cycles in female cynomolgus macaques. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9: 188.
- Nunney, L., Muir B. 2015. Peto's paradox and the hallmarks of cáncer: constructing

an evolutionary framework for understanding the incidence of cáncer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 370: 20150161.

Nyaoke A. C., Navarro M. A., Fresneda K., Diab S. S., Moore J., Lyras D., Awad M., Uzal F. A. 2020. *Paeniclostridium (Clostridium) sordellii*-associated enterocolitis in 7 horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32(2): 239–245.

Ochoa-Hernández A. B., Juárez-Vázquez C. I., Rosales-Reynoso M. A., Barros-Núñez P., 2012. La vía de señalización Wnt-B-catenina y su relación con cáncer. *Cir. Cir.* 80(4): 389-398.

Oksanen J., Blanchet F. G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlinn D., Minchin P. R., O'Hara R. B., Simpson G. L., Solymos P., Stevens M. H. H., Szoecs E. Wagner H. 2019. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-6. Disponible: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

OMS (Organización Mundial de la Salud). 2018. Cáncer. Consultado: 23 de Agosto de 2018. Disponible: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cáncer>.

Pacheco-Pérez Y., Bello-Fernández Z. L., Góngora-Parra K. B. 2019. Microbioma humano, implicaciones en el proceso salud-enfermedad. *Rev. Elec. Dr. Z. E. Marinello V.* 44(1).

Palmer L. J., Chapple I. L. C., Wright H. J., Roberts A., Cooper P. R. 2012. Extracellular Deoxyribonuclease Production by Periodontal Bacteria. *J. Periodontal Res.* 47(4): 439-45.

Panal C. M., Herrera M. M., Hardisson H. D., Choqueneira D. M., Román G. A., De Santiago G. F. J. 2014. Correlación entre la expresión de Ki67 con factores clásicos pronósticos y predictivos en el cáncer de mama precoz. *Rev. Senol. Patol. Mamar.* 27(4): 163-169.

Peñín I., Figueroa-Cabañas M. E., Guerrero-de la Rosa F., Soto-García L. A., Álvarez-Martínez R., Flores-Morán A., Acevedo-Whitehouse K. 2019. Transcriptional profiles of California sea lion peripheral NK and CD+8 T cells

reflect ecological regionalization and infection by oncogenic viruses. *Front. Immunol* 10:413

Pessier, A. P., J. K. Stern, and C. L. Witte. 2016. TP53 Gene and Cáncer Resistance in Elephants. *JAMA*. 315:1789.

Pinzón-Fernández M. V., Caldas-Arias L., Burgos A. S., Ibarra-Gimbuel D. S., Valencia-Mesa C. 2019. Mecanismos de patogenicidad y respuesta inmune de la infección por *Chlamydia trachomatis* y su relación con cáncer cervical. *Rev. CES Med.* 33(1): 51-59.

Poole P., Ramachandran V., Terpolilli J. 2018. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 16(5): 291-303.

Popoff M. R. 2018. *Clostridium difficile* and *Clostridium sordellii* toxins, proinflammatory versus anti-inflammatory response. *Toxicon*, 149: 54-64.

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596.

R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Disponible: <https://www.R-project.org/>.

RStudio Team. 2019. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc. Boston, MA. Disponible: <http://www.rstudio.com/>.

Rajagopala S. V., Vashee S., Oldfield L. M., Suzuki Y., Venter J. C., Telenti A., Nelson K. E. 2017. The human microbiome and cáncer. *Cáncer Prev. Res.* 10(4): 226-234.

Randhawa N., Gulland F. M. D., Ylitalo G. M., DeLong R., Mazet J. A. K. 2015. Sentinel California sea lions provide insight into legacy organochlorine exposure trends and their association with cáncer and infectious disease. *One Health.* 1:37-43.

- Ricaboni D., Mailhe M., Vitton V., Andrieu C., Fournier P. E., Raoult D. 2016. "*Negativibacillus massiliensis*" gen. nov., sp. nov., isolated from human left colon. *New Microbes New Infect.* 17: 36–38.
- Ricaboni D., Mailhe M., Cadoret F., Vitton V., Fournier P. E., Raoult D. 2017. '*Colidextribacter massiliensis*' gen. nov., sp. nov., isolated from human right colon. *New Microbes New Infect.* 17: 27-29.
- Riquelme E., Zhang Y., Zhang L., Montiel M., Zoltan M., Dong W., Quesada P., Sahin I., Chandra V., San Lucas A., Scheet P., Xu H., Hanash S. M., Feng L., Burks J. K., Do K. A., Peterson C. B., Nejman D., Tzeng C. W. D., Kim M. P., Sears C. L., Ajami N., Petrosino J., Wood L. D., Maitra A., Strausman R., Katz M., White J. R., Jenq R., Wargo J., McAllister F. 2019. Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. *Cell.* 178(4): 795-806.e12.
- Ritu W., Enqi W., Zheng S., Wang J., Ling Y., Wang Y. 2019. Evaluation of the associations between cervical microbiota and HPV infection, clearance, and persistence in cytologically normal women. *Cancer Prev. Res.* 12(1): 43-56.
- Rivera R., Robles-Sikisaka R., Hoffman E. M., Stacy B. A., Jensen E. D., Nollens H., Wellehan Jr. F. X. 2012. Characterization of a novel papillomavirus species (ZcPV1) from two California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Microbiol.* 155(2-4): 257-266.
- Robertson R. C., Manges A. R., Finlay B. B. Prendergast A. J. 2019. The Human microbiome and child growth – First 1000 days and beyond. *Trends Microbiol.* 27(2): 131-147.
- Romano-Keeler J., Weitkamp J. H. 2015. Maternal influences on fetal microbial colonization and immune development. *Pediatr. Res.* 77(0): 189-195.
- Ross, A. A., Rodrigues Hoffmann, A., Neufeld, J. D. 2019. The skin microbiome of vertebrates. *Microbiome* 7: 79.
- Rubinstein M.R., Wang X., Liu W., Hao Y., Cai G., Han Y. W., 2013. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-

cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*. 14(2): 195-206.

Ryan M. P., Pembroke J. T. 2018. *Brevundimonas spp*: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence*. 9(1): 480-493.

Sakamoto M., Iino T., Ohkuma M. 2017. *Faecalimonas umbilicata* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, and reclassification of *Eubacterium contortum*, *Eubacterium fissicatena* and *Clostridium oroticum* as *Faecalicatena contorta* gen. nov., comb. nov., *Faecalicatena fissicatena* comb. nov. and *Faecalicatena orotica* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67: 1219-1227.

Samuel S., Safeera A., Ahmed G., Rudrapathy P., Murugesan S., Dinju. 2019. Emergence of non-diphtheritic *Corynebacterium* as a co-pathogen in various clinical specimens in cancer patients. *En línea J. Health Allied Scs.* 18(1): 8.

Schliep K., Potts A. J., Morrison D. A., Grimm G. W. 2017. Intertwining phylogenetic trees and networks. *Methods Ecol. Evol.* 8: 1212-1220.

Schnorr S. L., Sankaranarayanan K., Lewis J. C. M., Warinner C. 2016. Insights into human evolution from ancient and contemporary microbiome studies. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 41: 14-26.

Sebastián D. J. J., Sánchez S. C. 2018. De la flora intestinal al microbioma. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 110(1): 51-56.

Sellors J. W., Sankaranarayanan R. 2003. La coloscopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical. Manual para principiantes. Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer. Lyon, Francia.

Seshadri R., Leahy S. C., Attwood G. T., Teh K. H., Lambie S. C., Cookson A. L., Eloe-Fadrosh E. A., Pavlopoulos G. A., Hadjithomas M., Varghese N. J., Paez-Espino D., Hungate1000 project collaborators, Perry R., Henderson G., Creevey C. J., Terrapon N., Lapebie P., Drula E., Lombard V., Rubin E., Kyrpides N. C., Henrissat B., Woyke T., Ivanova N. N., Kelly W. J. 2018. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the

- Hungate1000 Collection. *Nat. Biotechnol.*, 36(4): 359–367.
- Shade A., Handelsman J. 2012. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ. Microbiol.* 14(1): 4-12.
- Shalygin S., Kavulic K. J., Pietrasiak N., Bohunická M., Vaccarino M. A., Chesarino N. M., Johansen J. R. 2019. Neotypification of *Pleurocapsa fuliginosa* and epitypification of *P. minor* (*Pleurocapsales*): resolving a polyphyletic cyanobacterial genus. *Phytotaxa.* 392(4): 245.
- Shinha T. 2015. Fatal Bacteremia Caused by *Campylobacter gracilis*. *Emerg. Infect. Dis.* 21 (6):1084-1085.
- Son H. M., Yang J. E., Park Y., Han C. K., Kim S. G., Kook M., Yi T. H. 2013. *Sphingomonas kyungheensis* sp. nov., a bacterium with ginsenoside-converting activity isolated from soil of a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(10): 3848-3853.
- Swartz J. D., Lachman M., Westveer K., O'Neill T., Geary T., Kott R. W., Berardinelli J. G., Hatfield P. G., Thomson J. M., Roberts A., Yeoman C. J. 2014. Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH. *Front. Vet. Sci.* 1: 19.
- Tamburini S., Shen N., Wu H. C., Clemente J. C. 2016. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat. Med.* 22: 713-722.
- Tanaka N., Romanenko L. A., Kurilenko V. V., Svetashev V. I., Kalinovskaya N. I., Mikhailov V. V. 2014. *Loktanella maritima* sp. nov. isolated from shallow marine sediments. 64: 2370 – 2375.
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J. P., Ugarte E., Muñoz-Tamayo R., Paslier D. L. E., Nalin R., Dore J., Leclerc M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* 11(10), 2574–2584.
- Togo A. H., Durand G., Khelaifia S., Armstrong N., Robert C., Cadoret F., Di Pinto F., Delerce J., Levasseur A., Raoult D., Million M. 2017. *Fournierella*

- massiliensis* gen. nov., sp. nov., a new human-associated member of the family *Ruminococcaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67: 1393-1399.
- Tong Y., Zheng L., Qing P., Zhao H., Li Y., Su L., Zhang Q., Zhao Y., Luo Y., Liu Y. 2019. Oral microbiota perturbations are linked to high risk for rheumatoid arthritis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9: 475.
- Torcia M. G. 2019. Interplay among vaginal microbiome, immune response and sexually transmitted viral infections. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 266.
- Trigo T. F. J., Valero E. G. (Coord.). 2014. *Patología general veterinaria*. 5ª edición. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México, D. F.
- Ugge H., Carlsson J., Söderquist B., Fall K., Andén O., Davidsson S. 2018. The influence of prostatic *Cutibacterium acnes* infection on serum levels of IL6 and CXCL8 in prostate cancer patients. *Infect. Agent. Cáncer.* 13: 34.
- Valderrama M. M. M. 2017. Determinación y evaluación de la microbiota intestinal común a la población colombiana [Trabajo de grado]. Universidad EAFIT. Medellín, Colombia.
- Valenzuela-González F., Casillas-Hernández R., Villalpando E., Vargas-Albores F., 2015. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Cienc. Mar.* 41(4): 297-313.
- Waters J. L., Ley, R. E. 2019. The human gut bacteria *Christensenellaceae* are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol.* 17: 83.
- Wang J., Wang C., Li J., Bai. P., Li Q., Shen M., Li R., Li T., Zhao J. 2018. Comparative genomics of degradative *Novosphingobium* strains with special reference to microcystin-degrading *Novosphingobium* sp. THN1. *Front. Microbiol.* 9: 2238.
- Wang L. H., Wu C. F., Rajasekaran N., Shin Y. K. 2018. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell. Physiol. Biochem.* 51(6): 2647-2693.
- Wirth J. S., Whitman W. B. 2018. Phylogenomic analyses of a clade within the

roseobacter group suggest taxonomic reassignments of species of the genera *Aestuariaivita*, *Citreicella*, *Loktanella*, *Nautella*, *Pelagibaca*, *Ruegeria*, *Thalassobius*, *Thiobacimonas* and *Tropicibacter*, and the proposal of six novel genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68: 2393-2411

Witkin S. S., Linhares I. M. 2017. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota. *BJOG.* 124(4): 606-611.

Wood R. D., Mitchell M., Sgouros J., Lindahl T. 2001. Human DNA Repair Genes. *Science.* 291(5507): 1284-1289.

Yang X., Cheng G., Li C., Yang J., Li J., Chen D., Zou W., Jin S. Y., Zhang H., Li D., He Y., Wang C., Wang M., Wang H. 2017. The normal vaginal and uterine bacterial microbiome in giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Microbiol. Res.* 199: 1-9.

Ye H., Song T., Zeng X., Hou M., Xi M. 2018. Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Gynecol. Obstet.* 297(6): 1377-1387.

Yildirim S., Yeoman C. J., Janga S. C., Thomas S. M., Ho M., Leigh S. R., Primate Microbiome Consortium, White B. A., Wilson B. A., Stumpf R. M. 2014. Primate vaginal microbiomes exhibit species specificity without universal *Lactobacillus* dominance. *ISME J.* 8(12): 2431-2444.

Ylitalo G. M., Stein J. E., Hom T., Johnson L. L., Tilbury K. L., Hall A. J., Rowles T., Greig D., Lowenstine L. J., Gulland F. M. D. 2005. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Mar. Pollut. Bull.* 50(1): 30-39.

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7(1-2): 203-14.

Zhang S., Tsai S., Lo S. 2006. Alteration of gene expression profiles during mycoplasma-induced malignant cell transformation. *BMC Cancer* 6: 116.

Zhang Z., Yang J., Feng Q., Chen B., Li M., Liang C., Li M., Li Z., Xu Q., Zhang L.,

Chen W. 2019. Compositional and functional analysis of the microbiome in tissue and saliva of oral squamous cell carcinoma. *Front. Microbiol.* 10:1439.

Dirección General de Bibliotecas UAQ