



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Evaluación de la presencia y actividad del virus de papiloma humano de alto riesgo en el epitelio glandular cervical

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

FLOR JAZMIN CORTEZ HERNANDEZ

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

DR. GRECO HERNÁNDEZ RAMÍREZ
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

Ciudad de México. Marzo, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, por fungir como mi tutora principal y haberme aceptado en su grupo de investigación, así como por su dedicación, apoyo y arduo trabajo para contribuir a mi desarrollo.

A la M.C. María Cecilia Aguilar Zacarías, por su apoyo técnico durante todo el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Fernando Cruz-Talonia, por permitirnos el acceso a su clínica, así como por la realización de las revisiones colposcópicas y tomas de muestra.

Al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP), por su apoyo para la realización de una estancia internacional.

A la Dra. Dulce Papy-García, por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio, así como su disponibilidad, ayuda y consideración durante todo el proceso.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, por sus valiosas contribuciones y apoyo técnico brindado.

A Gerardo Vázquez Gómez, por su apoyo y contribución en la etapa experimental del proyecto.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Marcela Lizano Soberón y el Dr. Greco Hernández, por su guía, consejos y revisiones que ayudaron al desarrollo del presente trabajo.

Tabla de contenido

Resumen.....	1
Introducción	2
Anatomía del cérvix.....	2
Histología del cérvix.....	3
Epitelio escamoso estratificado.....	3
Epitelio glandular endocervical.....	4
Estroma.....	6
Unión escamocolumnar.....	6
Cáncer cervicouterino.....	7
Cáncer cervicouterino y VPH.....	9
Virus de papiloma humano	10
Genoma	11
Ciclo viral	12
Transformación celular por VPH.....	16
Eversión glandular.....	18
Antecedentes.....	19
Justificación	21
Hipótesis.....	22
Objetivo	22
Metodología.....	23
Material humano.....	23
Digestión del tejido.....	23
Extracción de ADN.....	23
Genotipificación	24
Extracción y purificación de RNA.....	24
Síntesis de cDNA.....	25
Actividad transcripcional por PCR	25
Inmunohistoquímica.....	25
Resultados y discusión	27
Genotipificación	27

Análisis de factores de riesgo.....	30
Actividad transcripcional de VPH en eversión glandular.....	32
Presencia de L1 por IHQ.....	33
Evaluación de los marcadores de proliferación ki67 y p16 ^{INK4a} por IHQ.....	37
Seguimiento de las pacientes.....	40
Conclusiones	43
Perspectivas	44
Bibliografía.....	45

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama del aparato reproductor femenino.....	2
Figura 2. Diferencias en la forma del os externo en mujeres (a) nulíparas comparado con (b) múltiparas.	3
Figura 3. Epitelio escamoso estratificado en (a) edad reproductiva y (b) edad avanzada o postmenopausica	4
Figura 4. Inmunohistoquímica de epitelio endocervical.....	5
Figura 5. Cortes histológicos de los tipos más comunes de carcinoma de cérvix.....	8
Figura 6. Cápside del virus de papiloma humano	10
.....	12
Figura 7. Esquema del genoma de VPH-16.	12
Figura 8. Organización del ciclo viral del VPH durante una infección.....	14
Figura 9. Vista colposcópica del cérvix humano.....	19
Figura 11. Edad y número de parejas sexuales en pacientes con VPH.	31
Figura 12. Infección productiva de VPH en epitelio escamoso estratificado. Las flechas señalan los núcleos teñidos de color café que denotan la presencia de la proteína L1 en el núcleo celular, característica de una infección productiva.	34
Figura 13. Ausencia de infección productiva en epitelio glandular endocervical y epitelio escamoso estratificado.	35
Figura 14. Ausencia del marcador de proliferación celular ki67 en tejido de ectopia cervical.	37
Figura 15. Presencia del marcador de proliferación celular p16INK4a en epitelio escamoso estratificado y ausencia en epitelio glandular endocervical.....	38
Figura 16. Presencia de L1, ki67 y p16INK4a en epitelio escamoso estratificado.	39

Índice de tablas

Tabla 1. Genotipificación de VPH en eversión glandular.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 2. Genotipos de VPH en infecciones múltiples.	29
Tabla 3. Evaluación de los factores de riesgo asociados a la infección por VPH.	30
Tabla 4. Comparación de factores de riesgo entre las infecciones múltiples y las simples.	32
Tabla 5. Actividad Transcripcional de VPH.	33
Tabla 6. Seguimiento de pacientes.	41

Resumen

El virus de papiloma humano o VPH es el agente causante de la infección de transmisión sexual de mayor prevalencia en el mundo y se estima que virtualmente el 100% de la población sexualmente activa se infectará con por lo menos uno de los diferentes genotipos de VPH a lo largo de su vida. Si bien la mayoría de las infecciones por VPH se revierten, se ha encontrado que los genotipos denominados de “alto riesgo” se encuentran asociados al desarrollo de diferentes tipos de cáncer como lo son el cáncer cervicouterino y otros de tipo anogenital.

Mientras que se tiene plena caracterización del mecanismo mediante el cual el VPH contribuye a la carcinogénesis del epitelio escamoso estratificado, del cual se deriva el carcinoma de células escamosas, se sabe poco acerca de su participación en el epitelio columnar glandular del endocérvix, epitelio del que se deriva el adenocarcinoma de cérvix. Hasta la fecha, no se tiene un método de detección temprana para adenocarcinoma ya que, al derivarse de tejido que se encuentra en el endocérvix, el acceso a la toma de muestras para su análisis está restringido. De esta forma, la eversión glandular, un fenómeno que ocurre en mujeres por influencia de cambios hormonales en el que el tejido endocervical evierte hacia el exocérvix, representa una oportunidad para el estudio de este epitelio.

Por esta razón en el presente estudio, con el objetivo de evaluar la presencia y actividad del VPH en el epitelio columnar glandular, se analizaron 127 muestras provenientes de eversión glandular mediante genotipificación por el ensayo de PCR multiplex de tipo específico. Se determinó la actividad transcripcional por RT-PCR de E6*I y se realizó inmunohistoquímica (IHQ) para L1 (proteína mayor de la cápside viral), ki67 y p16^{INK4a}, además de realizar un seguimiento a las pacientes al transcurrir un año de la toma de muestras.

Como resultado, se obtuvo que la prevalencia de VPH en esta población fue de 52.86%, predominando los genotipos de alto riesgo y siendo el VPH-16, el de mayor prevalencia. En cuanto a la actividad transcripcional, ya que no se encontraron transcritos de E6*I se considera que no existe actividad transcripcional de VPH en este epitelio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante IHQ para L1, ki67 y p16^{INK4a}, en dónde para ningún caso se mostró positividad en el epitelio glandular columnar. En estos experimentos, únicamente se observó tinción difusa en citoplasma en diversos fragmentos de tejido escamoso presentes en los cortes histológicos. De acuerdo con el seguimiento realizado a las pacientes, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo VPH positivo y el VPH negativo con respecto a la presencia de alteraciones inflamatorias y la presencia de infecciones bacterianas o fúngicas. De manera general, no se muestran mayores alteraciones en el cérvix a un año del tratamiento, mostrando una reincidencia de eversión glandular en solo el 1.36% de las pacientes.

Estos resultados sugieren que, aunque hay presencia de DNA de VPH en eversión glandular, no existe el desarrollo de un ciclo viral en el mismo, por lo que los mecanismos mediante los cuales el VPH contribuye a la carcinogénesis del epitelio columnar glandular del endocérvix continúan por ser estudiados.

Introducción

El virus de papiloma humano (VPH) es el agente infeccioso causante de la infección de transmisión sexual de mayor incidencia en el mundo. Actualmente, se estima que alrededor del 70% de la población mundial se encuentra infectada con al menos un tipo de VPH. Esta infección se considera un problema de salud pública en el mundo, principalmente por su relación con el desarrollo de distintos tipos de cáncer, de entre los que se encuentra el cáncer cervicouterino [1]. Dicho término comprende tanto al adenocarcinoma de cérvix como al carcinoma de células escamosas, cada uno derivado de un tipo celular distinto presente en el cérvix. Para entender el desarrollo de la infección y cómo ésta se relaciona con la manifestación de células cancerosas es necesario analizar el medio en el que estos eventos se desarrollan, explorando la anatomía del cérvix.

Anatomía del cérvix

Se conoce como cérvix o cuello uterino a la parte baja del útero que lo conecta con la parte superior de la vagina (ver [Figura 1](#)). En él pueden distinguirse 4 secciones: el exocérvix (o ectocérvix), el os externo, el canal endocervical (o endocérvix) y el os interno. Durante las exploraciones colposcópicas la parte que se puede observar es el exocérvix, seguido por el os externo, que como el término os indica (del latín “boca” u “orificio”), es el orificio que conecta el canal endocervical con la vagina. En la parte superior del os externo encontramos al canal endocervical que es el conducto que va del os externo al interno y que no es visible en las exploraciones. Finalmente tenemos al os interno, que marca la división entre el canal endocervical y el útero [2].

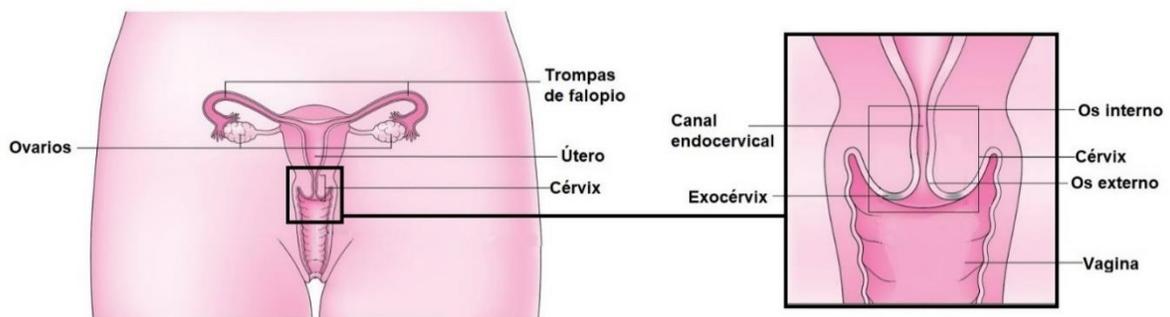


Figura 1. Diagrama del aparato reproductor femenino. En él se aprecia la posición del cérvix uterino humano. Del lado derecho se muestran las secciones que componen al cérvix. Modificado de [3].

En cuanto al tamaño y la forma del cérvix, éstos pueden variar dependiendo de la edad de la mujer, su estatus hormonal o de su paridad. Cuando se habla de una mujer que no ha

pasado por un parto, también denominada como nulípara, el cérvix tiene una forma cilíndrica y un tamaño aproximado de 3 cm de longitud y 2 cm de diámetro [4]. Una vez ocurrido un parto, la forma y tamaño del cérvix cambian debido a la dilatación que sufre y, aunque éste se reestructura después, las medidas finales continúan siendo mayor a las anteriores al parto. Otra de las características que cambian son la forma del os externo que como se aprecia en la Figura 2, en las mujeres nulíparas tiene una forma redondeada mientras que en una múltipara el os externo se extiende de forma horizontal.

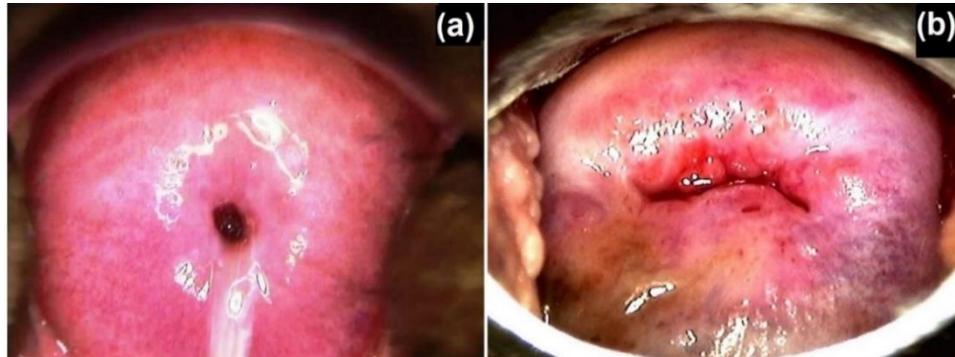


Figura 2. Diferencias en la forma del os externo en mujeres (a) nulíparas comparado con (b) múltiparas. Modificado de [5].

Histología del cérvix

Además de las diferencias anatómicas, cada sección del cérvix se encuentra revestida por diferentes tejidos, siendo éstos el estroma (tejido conectivo) y el epitelio glandular y el escamoso estratificado.

Epitelio escamoso estratificado

Como su nombre lo describe, el epitelio escamoso estratificado se compone de diferentes capas llamadas estratos, cada uno con un diferente nivel de diferenciación celular. En el primer estrato tenemos a las células basales, que forman una monocapa en la membrana basal que limita con el estroma y al ser células inmaduras conservan su capacidad para hacer mitosis. El siguiente estrato se denomina “parabasal” y se compone de varias capas de células de morfología ligeramente más alargada que la de las células basales y es posible encontrar figuras mitóticas en las primeras dos capas de este estrato. Finalmente, tenemos a la capa más superficial de este epitelio que está formado por células planas y elongadas con abundante citoplasma [6]. Es importante mencionar que el epitelio escamoso del cérvix es no queratinizado a diferencia de la piel.

La altura y diferenciación de este epitelio se encuentran fuertemente influenciados por la edad y los niveles hormonales presentes. En edad reproductiva, el epitelio escamoso estratificado se encuentra bien diferenciado y con una altura elevada, como se observa en la [Figura 3](#). Durante la infancia y el periodo postmenopáusico ocurre lo contrario y observamos una diferenciación pobre, así como una disminución en la altura de los estratos [7].

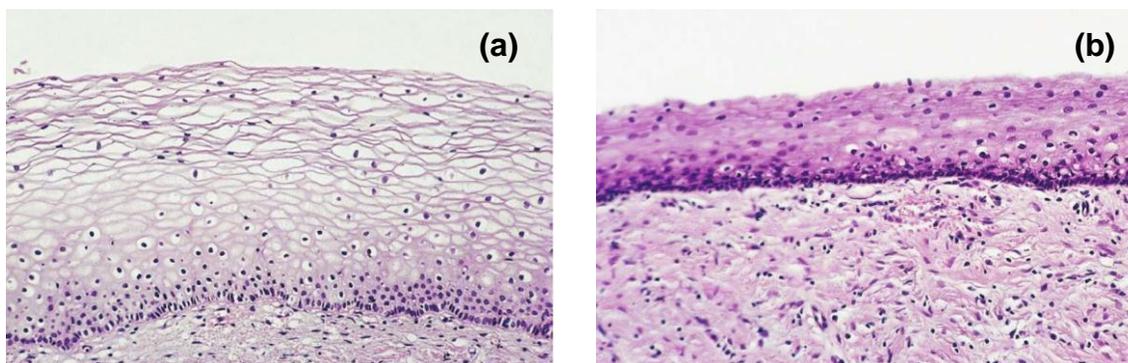


Figura 3. Epitelio escamoso estratificado en (a) edad reproductiva y (b) edad avanzada o postmenopausica. En ambos casos se muestra la tinción con hematoxilina/eosina. Modificado de referencia [7].

La respuesta a la estimulación hormonal previamente observada se debe principalmente a la progesterona y los estrógenos. Mientras que la progesterona induce el engrosamiento de la capa parabasal, ésta no lleva a la maduración completa de esta capa y en el caso de los estrógenos, éstos promueven tanto la proliferación como maduración completa de los tres estratos. De esta forma, durante la fase secretoria del ciclo menstrual o el embarazo, cuando la relación progesterona/estrógenos es elevada, la capa parabasal predomina y cuando la relación se invierte, como ocurre durante la fase proliferativa del ciclo menstrual o durante la administración de estrógenos de manera exógena, la capa superficial es predominante [8]. La estructura estratificada de este epitelio es importante ya que le brinda una composición robusta para fungir como una barrera física de protección ante la fricción mientras que las uniones intercelulares impiden el paso de patógenos hacia las capas inferiores del epitelio [9].

Epitelio glandular endocervical

Por otro lado, el canal endocervical se encuentra revestido por epitelio glandular columnar que, a diferencia del escamoso estratificado, éste se distribuye como una monocapa y no forma estratos. Lo componen células columnares secretoras de mucina con morfología cilíndrica que muestran un núcleo pequeño orientado hacia la membrana basal, además de abundante citoplasma en el que también encontramos presencia de moco. Su arquitectura

en el endocérnix forma invaginaciones llamadas criptas endocervicales. En una inspección visual colposcópica el epitelio columnar tiene una apariencia rojiza debido a que al ser una sola capa se puede observar la vascularización del estroma [10]. Debajo de la capa simple de células columnares encontramos a las células de reserva, cuyas diferencias morfológicas con las células columnares pueden apreciarse en la *Figura 4*. Las células de reserva son similares a las células basales encontradas en el epitelio escamoso, pero éstas muestran una capacidad bipotencial, siendo capaces de producir tanto mucina como queratina [7].

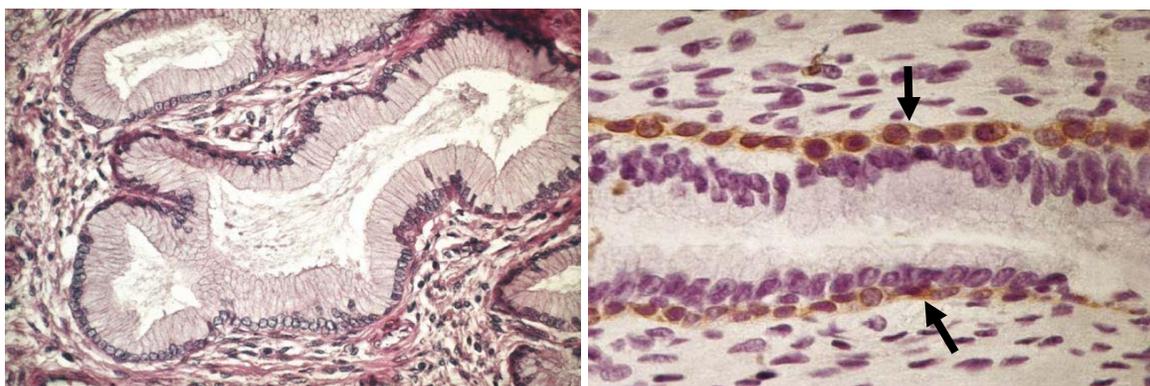


Figura 4. Inmunohistoquímica de epitelio endocervical. Células columnares del endocérnix con (a) tinción hematoxilina/eosina y (b) células de reserva mostrando reacción inmunohistoquímica positiva a citoqueratina KA 1. Las flechas señalan a las células de reserva. Tomado de referencia [7].

Al igual que el epitelio escamoso, el columnar glandular también muestra respuesta ante la regulación hormonal por progesterona y estrógenos. Esto se ve reflejado en los tipos de moco presentes en las diferentes etapas del ciclo menstrual. Como se mencionó anteriormente, las células columnares producen mucinas, que son glicoproteínas de alto peso molecular cuya función es proteger al tracto reproductivo superior de la invasión por agentes patógenos al tiempo que cumple sus funciones para promover o desfavorecer la reproducción [11]. Durante la fase proliferativa del ciclo menstrual el tipo de moco presente es el denominado estrogénico, que es ligero, acuoso y de muy baja viscosidad. Este tipo de moco es el responsable de ayudar al transporte de los espermatozoides por el tracto reproductivo femenino y es abundante en la fase ovulatoria. El otro tipo de moco es el progestacional o gestativo que se caracteriza por ser grueso y pegajoso, por lo que su función es bloquear el paso de los espermatozoides hacia el tracto superior y se encuentra altamente concentrado después de la fase ovulatoria y durante la fase secretoria del ciclo menstrual [12].

Estroma

Tanto el epitelio escamoso estratificado como el glandular endocervical requieren de un soporte que funcione como andamio para mantenerlos en posición y es el estroma quien cumple con esta función, entre muchas otras. El estroma se compone de colágeno, elastina y músculo liso, siendo su componente mayoritario el colágeno (70% de tipo I y 30% de tipo III), que corresponde al 80% de su estructura. En cuanto a la proporción de músculo liso, se estima de un 10-15% y este se encuentra distribuido aleatoriamente en el estroma mientras que la elastina cuenta apenas para un 0.9-1.6% [13].

Unión escamocolumnar

Existe una zona de transición abrupta donde el epitelio glandular y el escamoso se encuentran. A esta zona se le denomina unión escamocolumnar. Su posición con respecto al os externo varía dependiendo de la edad, estatus hormonal y paridad de la mujer. Antes de la primera menstruación la unión escamocolumnar se encuentra muy cerca del os externo, pero al llegar la pubertad los órganos genitales femeninos se desarrollan y aumentan en tamaño mientras que el canal endocervical se elonga por influencia de los estrógenos, lo que lleva a la eversión del epitelio endocervical hacia el exocérnix y coloca a la unión escamocolumnar lejos del os externo [14]. El epitelio columnar, ahora expuesto al ambiente ácido y hostil de la vagina es reemplazado por epitelio escamoso estratificado mediante dos posibles mecanismos. El primer mecanismo se denomina reparación ascendente y consiste en el sobrecrecimiento o proliferación del epitelio escamoso estratificado adyacente, que cubre al epitelio columnar expuesto [7]. El segundo se denomina metaplasia escamosa o reparación descendente y consiste en la transformación de un tipo celular maduro a otro [15]. Mediante este mecanismo el proceso comienza cuando las células de reserva proliferan y se diferencian a células escamosas, generando nuevo epitelio escamoso inmaduro y termina cuando la monocapa de células columnares se pierde dejando únicamente al nuevo epitelio escamoso estratificado en posición [16]. De esta forma se crea una nueva unión escamocolumnar y al área que se encuentra entre la unión escamocolumnar original y la nueva, donde ocurre el proceso de metaplasia, se le denomina zona de transformación [17]. Si los estímulos causantes de la metaplasia continúan, existe la posibilidad de que se presente una displasia, haciendo de la zona de transformación, un área de especial interés ya que la mayoría de los carcinomas de cérvix se originan en esta zona.

Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCU) es el cuarto tipo de cáncer de mayor incidencia en mujeres del mundo y causante de 311,365 muertes en el 2018 [18]. Éste se produce cuando las células del cérvix comienzan a dividirse de manera no controlada. Dichas células en constante división son hipertróficas, anaplásicas y afuncionales y crean una masa llamada tumor que crece hasta entorpecer las funciones del tejido mismo, además de competir por los nutrientes con las células funcionales. Esta masa puede además, invadir tejido sano adyacente y algunas de éstas células pueden desprenderse y esparcirse por el organismo en un proceso llamado metástasis [2].

El CaCU tiene la particularidad de desarrollarse de manera lenta, por lo que pueden pasar años hasta que se presenten síntomas, pero también brinda la oportunidad de ser detectado en etapas tempranas por lo que con revisiones ginecológicas regulares es altamente prevenible.

Las lesiones que preceden al CaCU se clasifican como neoplasias intraepiteliales cervicales de grado 1 al 3 (NIC1, NIC2 y NIC3) y de dejarse sin tratamiento, NIC2 y NIC 3 progresan al desarrollo de CaCU. Es importante mencionar que estas lesiones pueden encontrarse clasificadas también como displasias leves, moderadas y severas, así como lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado [19].

En NIC1, que corresponde a una displasia leve, encontramos que las células se observan maduras y con un mínimo de anormalidades en el núcleo, así como unas pocas figuras mitóticas y células no diferenciadas en la parte más profunda del epitelio. Para NIC 2 la presencia de figuras mitóticas y células no diferenciadas se extiende hasta la mitad del epitelio y se observan más anormalidades nucleares. Finalmente, para una NIC3 la diferenciación en los estratos es prácticamente nula, hay figuras mitóticas a través de todo el grosor del estrato así como anormalidades nucleares [10].

Como se mencionó anteriormente, el término CaCU comprende de manera general al cáncer desarrollado en el cérvix, pero como hemos revisado, en el cérvix tenemos la presencia de dos diferentes epitelios, el escamoso estratificado y el columnar glandular de los cuales se derivan respectivamente el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma de cérvix. La clasificación antes mencionada aplica únicamente para el carcinoma de células escamosas, ya que para el adenocarcinoma invasor no existe un

consenso sobre la clasificación de las lesiones premalignas y sólo se reconoce como tal al adenocarcinoma in situ.

En el carcinoma de células escamosas existen tres subdivisiones principales, de las cuales se observan cortes histológicos representativos en la *Figura 5*, siendo éstos el carcinoma no queratinizado de células pequeñas originado de las células de reserva, el carcinoma no queratinizado de células grandes derivado de epitelio metaplásico y el carcinoma queratinizado de células grandes, originado del epitelio escamoso del exocérnix [20]. De estos tres subtipos, el de mayor incidencia es el carcinoma no queratinizado de células grandes, que representa un 70% de los casos que se presentan anualmente, seguido por el carcinoma queratinizado de células grandes con un 25% y finalmente el de células pequeñas, con un 5% [7]. Otras variantes que se encuentran con mucho menor frecuencia son el carcinoma papilar de células escamosas que histológicamente puede parecer un papiloma benigno que pasa por un cambio celular displásico, el carcinoma tipo linfoepitelioma, que cuenta con extensas infiltraciones linfocíticas y el carcinoma verrucoso caracterizado por células escamosas queratinizantes bien diferenciadas e invasión estromal voluminosa observado principalmente en vulva y vagina.

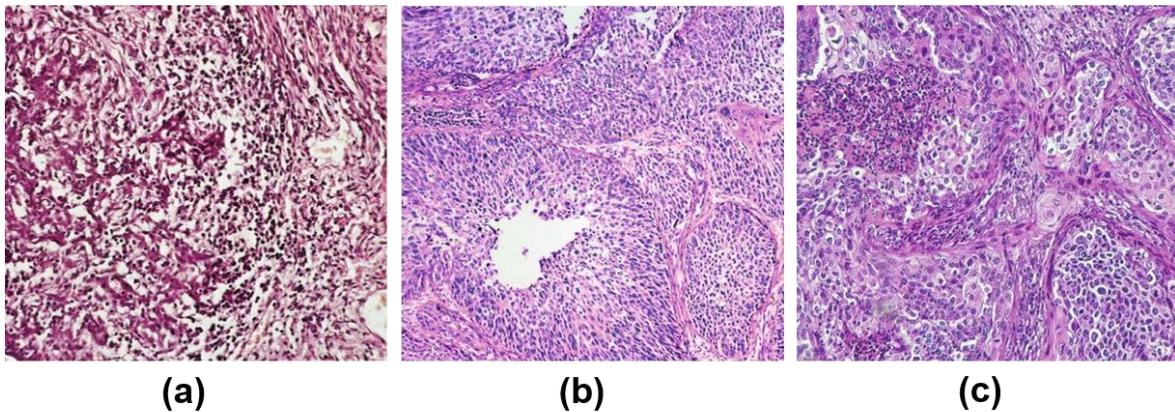


Figura 5. Cortes histológicos de los tipos más comunes de carcinoma de cérvix. En la subfigura (a) se muestra el carcinoma no queratinizado de células pequeñas, en (b) carcinoma no queratinizado de células grandes y (c) carcinoma queratinizado de células grandes con tinción hematoxilina/eosina en todos los casos. Modificado de referencia [7].

Para el caso del adenocarcinoma se reconoce como lesión premaligna únicamente al adenocarcinoma in situ, caracterizado por la aparición de células glandulares atípicas organizadas en un arreglo pseudoestratificado y que muestran agotamiento del contenido mucoso del citoplasma [19].

Si bien el carcinoma de células escamosas representa aproximadamente el 70% de los casos de CaCU y el adenocarcinoma de cérvix un 15-20%, se ha observado que mientras la incidencia de carcinoma de células escamosas disminuye, el de adenocarcinoma continúa incrementándose puesto que, en 1970, el adenocarcinoma de cérvix representaba apenas el 5% de los casos de CaCU [21]. Pese a las diferencias que existen entre el epitelio escamoso estratificado y el columnar glandular, cuando se trata de los tipos de cáncer derivados de estos, no se hace diferencia ni en el tratamiento ni en las estrategias de detección temprana, puesto que no existe ninguna para el adenocarcinoma, aun cuando éste posee un pronóstico más pobre por la tendencia que presenta a ser más extenso y a presentar metástasis linfógena y hematógena de manera temprana [22]. De manera general, se han implementado programas de prevención y detección temprana de CaCU, razón por la cual se considera que la incidencia de carcinoma de células escamosas ha disminuido. Dichos programas se basan en la detección y monitoreo del principal factor de riesgo para CaCU, el VPH.

Cáncer cervicouterino y VPH

En 1976, Harald zur Hausen propuso la hipótesis de que el virus de papiloma humano contenido en las verrugas genitales (condilomata acuminata) tenía relación con el cáncer cervical, debido a que mostraba un patrón epidemiológico similar. Hasta ese momento la comunidad científica consideraba que era el herpes simplex virus -2 (HSV-2) quién podría perfilarse como un posible causante o factor de riesgo para el CaCU, basados en los cambios citológicos observados en pacientes con anaplasias cervicales que correspondían a los generados por una infección con HSV-2 [23], [24].

Zur Hausen, también trataba de analizar la naturaleza de la relación entre el HSV-2 y el CaCU pero no le fue posible detectar DNA viral mediante hibridación de ácidos nucleicos en ninguna de sus muestras. Por esta razón zur Hausen realizó una revisión de literatura encontrando que, a diferencia de las verrugas genitales comunes, los condilomas podían volverse malignos y que se había encontrado presencia de VPH en ellos. A partir de esta observación zur Hausen propuso que el VPH podría estar relacionado con el desarrollo de CaCU, en lugar del HSV-2 [25]. Los trabajos posteriores de zur Hausen permitieron también identificar la presencia de DNA de VPH en biopsias de CaCU, así como algunos de los tipos virales mayormente representados como lo son el 6, 11, 16 y 18, estableciendo también que los tipos virales que causan condilomas no necesariamente causan CaCU y viceversa

[26]–[29]. La relevancia de sus aportaciones lo llevaron a recibir el premio nobel en el año 2008.

Actualmente la presencia de VPH en CaCU es ampliamente reconocida. En un estudio realizado por Saraiya M. y colaboradores se reportó la presencia de VPH (cualquier genotipo) en el 98.8% de los carcinomas in situ analizados dónde los genotipos predominantes son 16 y 18, representando un 62.6% [30]. De acuerdo con la agencia internacional de investigación en cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) se considera que existe una infección persistente de VPH en virtualmente todos los casos de CaCU y que este es necesario para el desarrollo de este tipo de cáncer [31].

Virus de papiloma humano

Taxonómicamente, el virus de papiloma humano pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Esta familia comprende un grupo de virus no envueltos cuyo material genético es DNA circular de doble cadena (5,748 a 8,607 pb) y poseen una cápside de un tamaño aproximado de 55 nm, con forma icosaédrica compuesta por 72 capsómeros [32], cuya representación y micrografía puede observarse en la *Figura 6*.

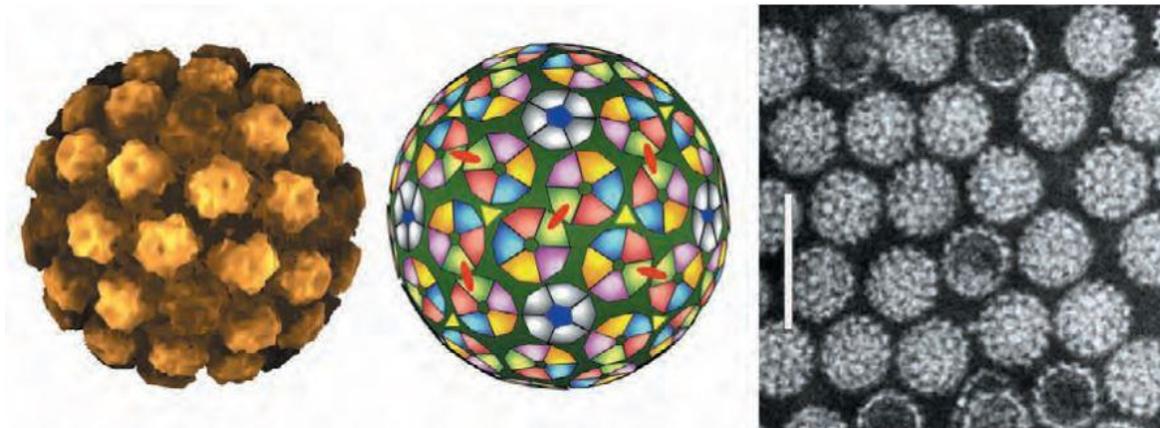


Figura 6. Cápside del virus de papiloma humano. Del lado izquierdo se muestra una representación atómica que combina reconstrucciones de imagen de microscopía electrónica de virus de papiloma bovino a una resolución de 9 Å, con coordenadas de la estructura cristalina de partículas tipo virus de VPH-16. En el centro, esquema que representa a los 72 capsómeros de la cápside y a la derecha una micrografía electrónica de contraste negativo de viriones de VPH-1. Tomado de [32].

Los virus de papiloma son especie-específicos, por lo que un determinado tipo de VPH puede infectar sólo a un hospedero dado. Se han observado virus de papiloma en aves, reptiles y mamíferos, pero no se han encontrado hasta la fecha en invertebrados.

Estos virus pueden infectar tanto epitelio cutáneo como mucoso y se transmiten por contacto directo. Pueden generar ya sea papilomas visibles como infecciones crónicas asintomáticas, pero la mayoría de los papiloma virus se han adaptado bien a sus hospederos y generan infecciones “benignas” [33].

Su clasificación se determina primero tomando en cuenta a la especie a la que infectan, y posteriormente con base en las diferencias encontradas en el marco abierto de lectura del gen L1 [34]. Se considera un tipo diferente de VPH cuando la secuencia de DNA de L1 difiere al menos en un 10% con respecto a los otros tipos de VPH. Actualmente existen 29 géneros de virus de papiloma, de los cuales sólo 5 corresponden a humanos, siendo estos los géneros alpha, beta, gamma, mu y nu [35].

Hasta el 2017 se tenían registrados 206 diferentes tipos de VPH y se espera que nuevos tipos continúen apareciendo [36]. En la actualidad se han subdividido a los VPH como de alto o de bajo riesgo, de acuerdo con su potencial para llevar al desarrollo de cáncer, pero esta no es una clasificación taxonómica. Los tipos virales mayormente representados de la clasificación de alto riesgo son VPH16 y 18 mientras que VPH6 y 11 representan a los de bajo riesgo.

Genoma

El genoma del VPH se organiza en 3 secciones. La región de expresión temprana o denominada E (early), la de expresión tardía L (late) y la región larga de control. En la región E se encuentran genes que codifican para proteínas relacionadas con la replicación, transcripción y la manipulación del medio celular. En la región L se encuentran los genes que codifican para las proteínas que componen a la cápside viral, siendo estas L1 (componente mayoritario) y L2. Finalmente, en la región larga de control se encuentra el origen de replicación y los sitios de unión de los elementos regulatorios y factores de transcripción. En la Figura 7 se observa el esquema del genoma del VPH-16 como ejemplo, con sus respectivos marcos de lectura abiertos.

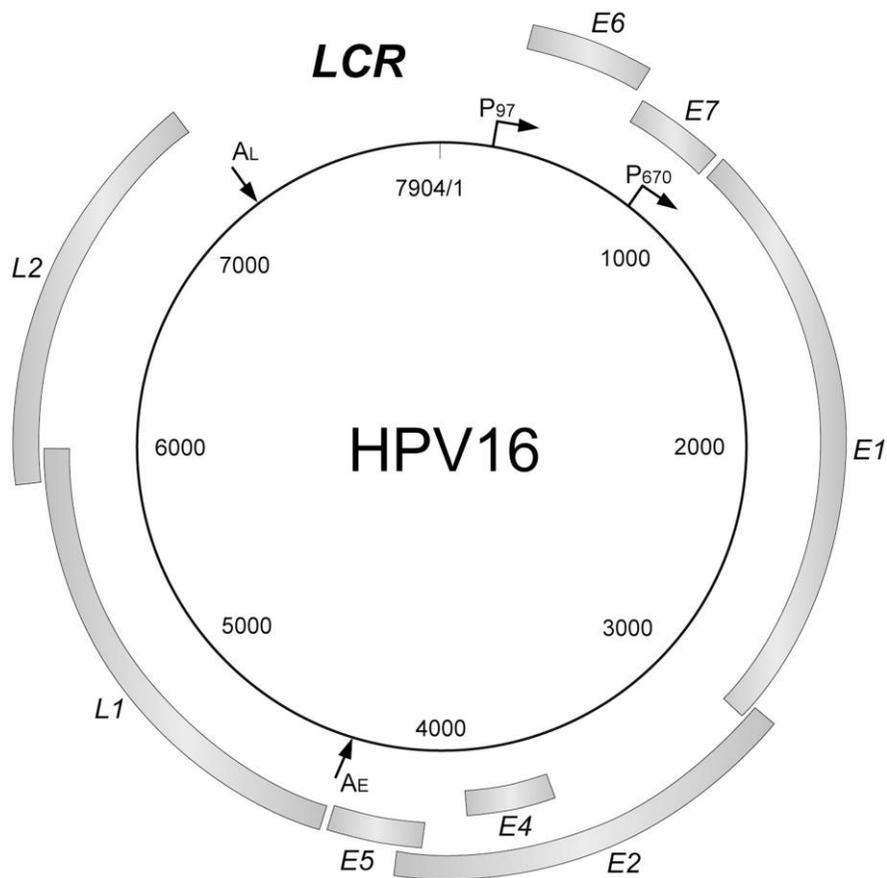


Figura 7. Esquema del genoma de VPH-16. Se observan los 8 marcos de lectura abiertos que contienen los genes necesarios para las diferentes etapas del ciclo viral. También se observan los elementos promotores PE (o p97) y PL (p670) así como los sitios de poliadenilación temprano y tardío AE y AL. Tomado de [37].

El genoma viral del VPH cuenta con 8-10 marcos de lectura abiertos que incluyen a los genes que codifican para las proteínas estructurales L1 y L2, y las no estructurales E1 a E8, pero hasta la fecha no existen reportes de proteínas virales asociadas a los marcos de lectura correspondientes a E3 y E8 [32] y en algunos casos estos se han perdido.

Ciclo viral

Para que la infección pueda darse es necesario que el virus llegue hasta su célula diana, la célula basal del epitelio escamoso estratificado, por lo que se requiere de la presencia de una microlesión que permita el paso de los viriones hasta el estrato basal, donde se encuentran dichas células. Una vez que se tiene contacto, es momento de la internalización.

Hasta la fecha existe discusión sobre el mecanismo de entrada del virus, pero se considera que los proteoglicanos de heparán sulfato cumplen un papel importante al establecer el primer contacto con la cápside viral [38]. Los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs por sus siglas en inglés) son moléculas con un núcleo proteico al que se encuentran unidas

cadena lineares de polímeros polidispersos con diferentes patrones de sulfatación (HS). Dichos polímeros están formados por unidades alternadas de α -D-glucosamina y ácido β -D-glucurónico o ácido α -L-idurónico [39]. Los HSPGs pueden encontrarse tanto en la matriz extracelular como en la superficie de muchos tipos celulares siendo los más comunes los sindecanos y los glipicanos. Mientras que los glipicanos son característicos del sistema nervioso central, los sindecanos predominan en las células epiteliales. Particularmente el sindecano-1 aumenta sus niveles de expresión cuando se pasa por el proceso de cicatrización de una herida, que como mencionamos anteriormente, se considera necesario para que el VPH pueda llegar a la membrana basal [40].

De esta forma, la proteína L1 de la cápside viral interacciona con el HS mediante los residuos de lisina 278, 356 y 361, lo que genera un cambio conformacional en la proteína L2 [41]. Esto expone el extremo N-terminal de L2, en donde se encuentra un sitio de escisión para proproteína convertasa del tipo furina. El corte en el sitio de escisión parece ser un paso importante en el proceso de internalización, ya que se ha observado que pseudo viriones previamente escindidos en el extremo N-terminal de L2 son capaces de unirse e infectar células deficientes en HSPGs, por lo que se cree que esta escisión lleva a un nuevo cambio conformacional que separa al virión de su unión con el HS y permite su interacción con un segundo receptor [42]. Para este punto, se han propuesto como posibles segundos receptores a α 6- β 4 integrina, tetraspanina CD151 y el heterotetrámero de anexina A2, principalmente porque todos ellos se encuentran altamente expresados en el estrato basal del epitelio escamoso estratificado, aunque α 6- β 4 integrina es el mayormente aceptado [43]. Posterior a estas interacciones, el virión pasa por un proceso de endocitosis mediada por clatrina, aunque se ha observado que algunos tipos virales como VPH31 son sensibles a la vía caveolar, lo que sugiere que distintos tipos de VPH podrían usar diferentes vías de internalización [40].

Posterior a la entrada y la pérdida de la envoltura de L1, L2 forma un complejo con el genoma del virus y escapan del endosoma tardío para después translocarse al núcleo. La forma en la que esto ocurre es desconocida, pero se hipotetiza que la entrada del complejo DNA/L2 al núcleo podría ocurrir durante la mitosis, cuando la membrana nuclear se desensambla [44]. Una vez en el núcleo, el ciclo viral en las nuevas células hospederas comienza.

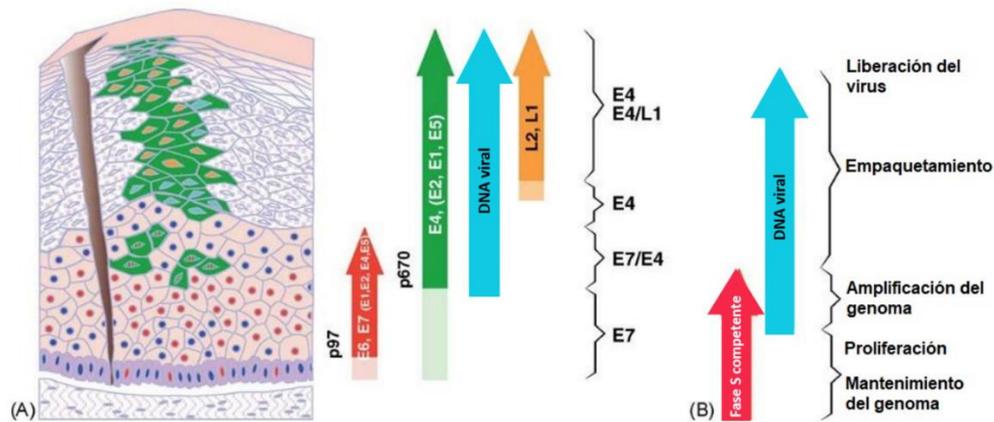


Figura 8. Organización del ciclo viral del VPH durante una infección productiva. (A) Esquema del epitelio escamoso estratificado. Se muestra en código de colores la expresión de los genes virales en los diferentes estratos. (B) Actividad correspondiente a la expresión de los genes señalados en la figura (A). Modificado de referencia [45].

Para el VPH, se encuentra bien definido que el ciclo viral está ligado al proceso de diferenciación del epitelio escamoso estratificado, de forma que se observa expresión de diferentes genes virales a lo largo de los estratos, tal y como se observa en la [Figura 8](#).

El ciclo comienza con la división de las células basales, en la cual se replica también el genoma viral y una copia pasa a la célula hija y otra se queda en la célula madre, proceso en el que participan las proteínas virales E1 y E2. Para lograr esta tarea, el gen E1 que codifica para una proteína tipo helicasa del mismo nombre, se expresa. Dicha helicasa es dependiente de ATP y tiene actividad enzimática, su forma activa es hexamérica [46]. Por si sola se une al DNA en el origen de replicación con poca afinidad, por lo que requiere de un estabilizante, la proteína E2. Además de su interacción con E2, E1 ha mostrado interacción con la subunidad p180 de la ADN polimerasa α -primasa celular, reclutando así la maquinaria de replicación celular en el origen de replicación viral.

Continuando con la proteína E2, ésta se une mediante sus dominios de unión a DNA con una alta afinidad a sus sitios de unión en el origen de replicación, dónde recluta a E1 a través de su extremo N-terminal, también conocido como dominio de transactivación, que interactúa con el extremo C-terminal de E1. Esta unión no solo recluta a E1 al ori, sino que también impide que esta se una inespecíficamente a DNA celular [47]. Entre otras funciones de E2 se reconoce su participación en la segregación del genoma viral uniéndose a este y a los cromosomas celulares cuando las células basales se dividen, asegurándose de que las células hijas porten genoma viral también [48]. E2 además ha mostrado ser un regulador

negativo del promotor P₉₇, que dirige la expresión de E6 y E7, por lo que mientras E2 se exprese los niveles de E6 y E7 se mantienen controlados [49].

El siguiente paso es continuar con la replicación del genoma. En un epitelio normal las células que migran al estrato parabasal salen del ciclo celular y entran en un proceso de diferenciación terminal. Sin embargo, cuando existe una infección por VPH en estas células, comienza la expresión de los genes virales E6 y E7, que trabajan en conjunto para que el ciclo celular progrese. Esto lo logran mediante dos estrategias: la primera por la interacción de E7 con la proteína del retinoblastoma o pRb, que es considerada con actividad supresora de tumores, puesto que se une a integrantes de la familia de factores de transcripción E2F [50]. Cuando estos factores de transcripción interactúan con sus genes blanco, la célula entra en la fase S del ciclo celular. De esta forma, cuando pRb se une a estos factores, el ciclo celular no progresa hasta que pRb se fosforila y libera a E2F. Es así como la proteína viral E7 promueve la progresión del ciclo celular interactuando con pRb, dicha unión libera al factor E2F al que pRb se encontraba unido y la célula entra en la fase S del ciclo celular [51].

El segundo mecanismo tiene como blanco a p53, proteína antitumoral conocida como el “guardián molecular del genoma”. P53 es sensible a cambios que indiquen estrés, como lo son la inestabilidad genómica, el aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno, la hipoxia y la activación de oncogenes. Estas señales generan cambios postranscripcionales en p53 que la estabilizan y le permiten activar a sus genes blanco, involucrados en procesos como apoptosis, arresto del ciclo celular, reparación de DNA, mecanismos antioxidantes y regulación metabólica [52]. La proteína viral E6 posee la capacidad de unirse a la ubiquitin ligasa E6AP mediante su dominio de reconocimiento de sustratos N-terminal, redireccionando su especificidad hacia p53, por lo que el complejo E6-E6AP marca a p53 para su degradación por proteosoma [53]. Sin p53, la célula no entra en arresto celular al identificar la entrada extra a la fase S (causado por E7), y tampoco se genera apoptosis al acumular daños al genoma, lo que contribuye al desarrollo de malignidad en las células. Por esta razón tanto E6 como E7 son consideradas oncoproteínas virales y tienen un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento del proceso de transformación de las células epiteliales a cancerosas.

El siguiente paso del ciclo consiste en la amplificación del genoma, por lo que se observa un incremento en la expresión de los genes tempranos E1, E2, E5, E6 y E7. Esta se

desarrolla en el estrato intermedio, dónde comenzamos a observar a la proteína E5 que presenta diferentes funciones relacionadas con el tráfico vesicular de la célula. Esta proteína se une directamente a la subunidad de 16 kD de la ATPasa vacuolar [54], interfiriendo con el proceso de acidificación del endosoma e impidiendo así la degradación del receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR, por sus siglas en inglés), lo que eleva la cantidad de EGFR en la membrana de la célula [55]. Este mismo mecanismo interfiere también con la respuesta inmune ya que se ha observado que impide la correcta carga de los péptidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) clase II [56] y promueve la retención de MHC clase I en el aparato de Golgi [57].

Conforme las células infectadas se acercan a los estratos superiores se observa también la expresión del gen que codifica para la proteína E4, cuya participación exacta se desconoce, pero se ha observado una acumulación de la misma en el citoplasma y se relaciona con la disrupción y colapso de las redes de citoqueratina de la célula, dejando intacta a la tubulina y las redes de actina [58]. Este efecto puede interpretarse como una contribución a la movilidad del virus para su futura liberación. El producto mayoritario del gen E4 se traduce de un ARNm que incluye el codón de iniciación de E1 y las secuencias adyacentes de E4 (E1^{E4}) [59].

Finalmente, en el estrato superficial se procede con la última fase del ciclo, que corresponde al ensamblaje de los viriones y empaquetamiento del genoma del virus, para su posterior liberación. Para esto se requiere de la expresión del gen L2, la salida del ciclo celular, y la expresión del gen L1 [60]. El empaquetamiento del genoma requiere del reclutamiento de la proteína L2 por medio de E2 a las regiones de replicación viral [61].

Posterior a esto, la expresión de L1 y el ensamblaje de la cápside icosaédrica comienzan en el núcleo. Una vez ensambladas las cápsides y con el genoma empaquetado, el ambiente oxidativo de las células superficiales del epitelio genera la acumulación de puentes disulfuro entre las proteínas L1, brindándole estabilidad a las cápsides [62]. Para finalizar el ciclo solo resta la liberación de las cápsides virales del estrato superficial del epitelio por medio de la desescamación del mismo.

Transformación celular por VPH

Aunque la incidencia de VPH es elevada, en promedio el 80% de las infecciones no progresan y tienden a ser eliminadas por el sistema inmune del hospedador [63]–[66]. Para

los casos en los que se logra una infección persistente, con el tiempo ocurre un evento no programado en el ciclo viral del VPH que promueve la progresión hacia la transformación maligna, la integración del DNA viral al del hospedador.

Aunque existen diversos factores que contribuyen a la transformación maligna en una célula, en CaCU el desarrollo del ciclo viral y la integración del DNA son pasos determinantes. Esto se puede observar al identificar el estado físico del DNA de los tipos virales de mayor incidencia, VPH16 y 18 en carcinomas invasores. En estos estudios se ha encontrado que para VPH16 del 35.4-72% muestra DNA viral integrado, del 20-27.8% contiene DNA aun en estado episomal y un 27-36.7% muestra sólo DNA episomal, mientras que para VPH18 se ha encontrado únicamente la forma integrada en el 100% de los casos [67]–[69].

El mecanismo mediante el cual el genoma del VPH se integra al del hospedador se desconoce, pero se ha identificado que en la mayoría de los casos la región del genoma que se integra comprende a los genes E6 y E7, junto con la región regulatoria corriente arriba (URR, por sus siglas en inglés) [70]. La pérdida o disrupción de E2 también es rasgo conservado en la mayoría de los genomas integrados [71], [72]. De esta forma, ya que E2 tiene una función regulatoria sobre E6 y E7, al integrarse al genoma sin E2, se produce una expresión no controlada de los llamados oncogenes virales. Como se analizó anteriormente, dado que en conjunto los productos de la expresión de estos genes promueven la proliferación celular y evitan apoptosis y reparación de DNA, las células con este fragmento de genoma viral integrado comienzan a presentar inestabilidad genómica. Además, también se ha observado que E6 posee la capacidad de activar a hTERT, contribuyendo a la inmortalización de las células [73].

De esta forma, la integración del DNA viral al del hospedero genera proliferación celular, inestabilidad genómica e inmortalización de las células, contribuyendo al proceso de transformación maligna.

Como se puede observar, la participación del VPH en el proceso de carcinogénesis que ocurre en el cérvix está respaldada por la literatura. Por esta razón las estrategias para erradicar el CaCU se han enfocado en la prevención de la infección por los tipos virales de alto y bajo riesgo de VPH y a la detección temprana de las infecciones que no pudieron prevenirse. Actualmente se conocen 3 diferentes vacunas que cubren a los tipos virales más comunes. La bivalente para VPH16 y 18 producida por GlaxoSmithKline plc.

(Middlesex, UK), la tetravalente que cubre a los tipos virales 6, 11, 16 y 18 y la nonavalente que cubre a VPH6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58, ambas producidas por Merck (Rahway, NJ, USA) [74].

La disminución en la incidencia de CaCU observada en los últimos años se atribuye tanto a los esquemas de vacunación implementados alrededor del mundo [75] como a los programas de detección temprana que incluyen al Papanicolau. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, mientras que el carcinoma de células escamosas parece responder a estos esfuerzos y ha disminuido en incidencia, el adenocarcinoma continua en aumento [21]. Las vacunas actuales son profilácticas por lo que sólo son efectivas para prevenir, pero no contra infecciones ya existentes, de manera que el screening cervical sigue siendo una herramienta indispensable para la prevención del CaCU [76]. En este caso las limitaciones del screening con respecto al adenocarcinoma se deben principalmente a que éste se desarrolla en el endocérvix, que no es accesible para la toma de muestras que se utiliza en estos exámenes, puesto que usualmente se colectan células solo del exocérvix. Los problemas de muestreo generan falsos negativos en al menos el 50% de los casos [77], [78].

Para poder analizar al epitelio columnar glandular y lo que en él ocurre, es necesario primero tener acceso a él, por lo que una alternativa para el estudio de este epitelio se encuentra en un proceso que ocurre de manera natural en las mujeres, denominado eversión glandular o ectopia cervical.

Eversión glandular

Este proceso consiste en la eversión del epitelio glandular columnar que normalmente se encuentra en el endocérvix hacia el exocérvix, entrando en contacto con la porción vaginal. Mientras que un cérvix normal se observa con una textura lisa y una tonalidad rosa pálido en un examen colposcópico, la eversión glandular se distingue por su textura granular y tonalidad rojiza (ver *Figura 9*). Ésta puede presentarse de manera natural durante diferentes etapas del desarrollo de una mujer como la pubertad y el embarazo, puesto que se regula de manera hormonal y responde a niveles elevados de estrógenos [8]. Por esta misma razón también puede presentarse cuando se está bajo el uso de anticonceptivos orales [79].

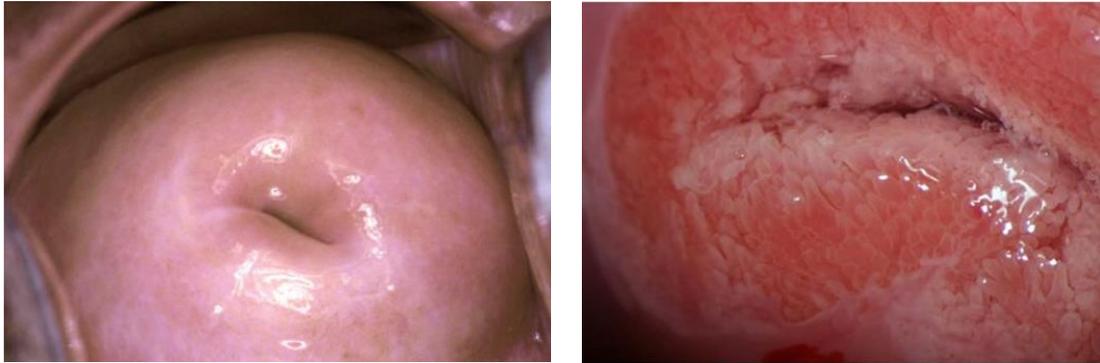


Figura 9. Vista colposcópica del cérvix humano. Se observa un cérvix normal (lado izquierdo) y un cérvix que muestra eversión glandular (lado derecho). Tomado de referencia [80].

Debido a que el epitelio columnar tiene una mayor fragilidad al ser solo una monocapa de células, la exposición al medio hostil de la vagina puede generar daños que permitan el acceso de patógenos al organismo. Por esta razón la ectopia cervical ha sido propuesta como un factor de riesgo para contraer infecciones, tales como *Chlamydia Trachomatis* [81] y VIH [82].

Aun con su asociación como posible factor de riesgo ante infecciones, la eversión glandular no se trata con frecuencia, ya que se considera una condición fisiológica normal que puede “revertirse” por el propio organismo mediante reparación ascendente o descendente, como se describió previamente. Únicamente se considera el tratamiento cuando se presenta alguna sintomatología molesta como lo es el exceso de flujo vaginal o los sangrados postcoitales o por contacto [83]. En este caso se procede a retirar el tejido ectópico por medio de técnicas como escisión superficial, diatermia, criocirugía o tratamiento con láser [84]. Finalmente, la zona sufre una re-epitelización y cicatriza completamente.

Antecedentes

En 1986, Toon et al. realizó un estudio analizando dos grupos, uno de 106 pacientes con cambios inflamatorios no específicos y otro con 104 que mostraron citología cervical normal y se tomaron biopsias. De ambos grupos, 49 de las 210 muestras provenían de ectopia cervical y 14 de ellas (29%) fueron además positivas a VPH. En este estudio la presencia de ectopia cervical no era un objetivo de estudio y fue una observación de la población que utilizaron, por lo que se sugiere que dicha positividad podría deberse a la presencia del virus en la unión escamocolumnar y no se indaga más al respecto [85].

Posteriormente en el 2002, Duttagupta et al. publicaron un estudio con el propósito de determinar una estrategia de detección de CaCU basada en VPH, que fuese eficiente pero rentable para mujeres de zonas rurales en la India. Se incluyeron un total de 850 muestras dónde las pacientes mostraron una media de edad de 29.07 años (entre 14 y 80). Entre sus resultados encontraron que existía una relación significativa entre las mujeres jóvenes (edades ≤ 23 años) que presentaron ectopia cervical y la positividad a VPH16/18, pero que este resultado no podía observarse tomando solo en cuenta la citología y la inspección con ácido acético. Por estas observaciones, concluyen que mujeres con edad menor o igual a 23 años y que presenten ectopia cervical deben ser analizadas para VPH ya que son un grupo de riesgo [86].

En el 2004, nuestro grupo de investigación realizó un estudio con el propósito de determinar la prevalencia de VPH y VPH16 en ectopia cervical. Rocha-Zavaleta analizó tres grupos: el primero con pacientes que mostraron ectopia cervical (n=218) y ninguna evidencia de presencia de VPH, el segundo con pacientes que tenían lesiones asociadas a VPH (n=111) y el último grupo, un control con pacientes (n=93) que no mostraban evidencia colposcópica, citológica o patológica de infección por VPH o ectopia cervical. Como resultado se encontró que el 12.9% de las pacientes del grupo control mostraron positividad a VPH, pero sólo el 1.07% fue positivo a VPH16. En el grupo de ectopia cervical la positividad fue de 23.3%, de los cuales el 6.8% correspondía a VPH16. De esta forma, existe una diferencia significativa en la positividad a VPH cuando se compara al grupo de pacientes control contra el de ectopia cervical, mostrando que aquellas con ectopia son más susceptibles a contraer la infección por VPH [87].

Continuando con esta línea, en el 2010 se publicó otro estudio realizado por nuestro grupo de investigación en el que se evaluó la prevalencia de diferentes genotipos de VPH en pacientes con ectopia cervical, citología normal y con lesiones intraepiteliales de bajo grado. En esta ocasión se encontró que la prevalencia de VPH en pacientes con citología normal fue de 30.5%, mientras que para las pacientes con ectopia cervical fue de 73.7%. Para ambos casos el tipo viral predominante fue el VPH18 (21.9 y 53.9% respectivamente). De este modo se respalda la observación de los trabajos previamente mencionados de que la presencia de VPH se observa con mayor frecuencia en pacientes con ectopia cervical y se propone que estudios sobre el potencial oncogénico del virus en las células columnares presentes en el tejido ectópico son necesarios [88].

En contraste con estos resultados, Hwang et al. reportaron un estudio de 138 mujeres jóvenes y adolescentes con una media de edad de 16.7 años, en donde pretendían evidenciar la relación que existe entre la extensión de la ectopia cervical y el riesgo de contraer una infección por VPH. Como resultado obtuvieron que no existía diferencia significativa al evaluar la prevalencia de VPH comparando la extensión de la ectopia. Ellos atribuyen estos resultados a que el estudio consideró sólo infecciones nuevas, a diferencia del resto de los reportes de la literatura [89].

Hasta este punto, los reportes de la literatura indican que la prevalencia de VPH en pacientes con ectopia cervical es mayor comparada con pacientes sin ectopia, pero el aspecto del estudio de la posible actividad o función del VPH en el epitelio columnar glandular que se encuentra en el ectropión no se ha abordado.

Nuevamente en nuestro grupo de investigación, para determinar el potencial oncogénico del VPH16 y 18 presente en muestras de pacientes con ectopia cervical, Vázquez-Burgos realizó un estudio de la expresión de las proteínas que participan en el ciclo celular p16^{INK4a} y ki-67. En este caso, de 56 muestras positivas para VPH (varios tipos), el 30.3% mostraron positividad a la tinción para p16^{INK4a} y ki-67 por inmunocitoquímica. La positividad a p16^{INK4a} es un indicador de la presencia de las oncoproteínas E6 y E7, mientras que ki-67 es un indicador de proliferación celular. Con esto se plantea evidencia de la posible actividad del VPH en muestras con ectopia cervical [90].

Justificación

Mientras que la incidencia de carcinoma de células escamosas disminuye, la de adenocarcinoma continúa aumentando y las estrategias para erradicar al CaCU no toman en cuenta especificaciones particulares para el adenocarcinoma. Hasta la fecha no se tiene información sobre cómo el VPH promueve la transformación celular en células del epitelio columnar glandular. Si bien, estas células son clasificadas como no permisivas para el ciclo viral del VPH al no presentar el programa de diferenciación celular que éste requiere, la presencia del virus podría generar otros cambios en la célula, ajenos a la expresión de sus genes virales.

El estudio de este epitelio resulta complicado al encontrarse en el endocérvix, razón por la que la ectopia cervical representa una oportunidad para estudiar al epitelio columnar

glandular, ya que expone dicho epitelio a la zona dónde normalmente se encuentra el exocérvix.

Trabajos previos han mostrado que pacientes con ectopia cervical tienen un mayor riesgo de contraer una infección por VPH y que hay evidencia de proliferación celular en pacientes con ectopia cervical y diagnóstico positivo a VPH. Por esta razón, la realización de más estudios para determinar cuál es el papel de este virus en el epitelio columnar glandular son necesarios.

Estos estudios ayudarán a validar si existe una tendencia a contraer la infección por VPH en tejido de ectopia cervical, así como al estudio de lo que la presencia del VPH en este epitelio puede ocasionar y de esta forma en un futuro contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para la detección temprana del VPH en este epitelio.

Hipótesis

Dado que el epitelio glandular endocervical no es permisivo a la infección por VPH, los virus presentes en dicho tejido serán transcripcionalmente inactivos y no tendrán impacto en la respuesta al tratamiento de la eversión glandular.

Objetivo

Determinar si existe expresión de mensajeros y de proteínas de VPH en células del epitelio glandular cervical, así como su impacto en el tratamiento de eversión glandular.

Objetivos específicos:

- Determinar los genotipos de VPH presentes en las muestras de eversión glandular mediante PCR para la formación de los grupos de estudio.
- Evaluar si hay expresión de genes virales mediante RT-PCR.
- Evaluar la presencia de procesos de infección productiva de VPH mediante la proteína L1 por IHQ.
- Identificar marcadores de la actividad de E6/E7 como p16 y Ki67 en cortes histológicos por medio de IHQ.
- Evaluar el impacto del VPH en eversión glandular y la eficacia en el tratamiento, realizando el seguimiento de las pacientes participantes.

Metodología

Material humano

El grupo de estudio fue seleccionado de mujeres que asistieron a la clínica de colposcopia Fundación Cruz-Talonia en la ciudad de México. Las pacientes que, bajo una examinación colposcópica presentaron parches o zonas irregulares de epitelio columnar con papilas y hendiduras, indicativo de eversión glandular y sin cambios aceto-blancos en la zona de transformación al aplicar ácido acético al 5%, fueron invitadas a participar. Un segundo grupo que mostró cambios aceto-blancos en exocérnix, indicativo de infección por VPH (IVPH), fue incluido como control. Las mujeres que aceptaron participar en el estudio firmaron un consentimiento informado y contestaron el cuestionario de antecedentes médicos. En total, 201 mujeres aceptaron participar en el estudio.

En todos los casos, antes del procedimiento se realizó un lavado del cérvix con 1 ml de PBS estéril, mismo que se recuperó junto con el moco cervicovaginal y se conservó a -20°C. Posterior al lavado, la pieza quirúrgica fue removida mediante electrocirugía por un colposcopista experimentado y se colocó en 2 ml de PBS estéril a 4°C, dónde se mantuvo hasta su procesamiento.

Todas las piezas quirúrgicas fueron procesadas el mismo día de su colecta. Para el procesamiento se procedió a remover las partes del tejido calcinadas por la electrocirugía y una vez limpia la pieza ésta se dividió en 3 fragmentos: un fragmento se colocó en 1 ml de PBS estéril a 4°C durante toda la noche para posteriormente conservarse en una solución de formalina al 10% tamponada hasta incluirse en parafina. Un fragmento más se colocó en refrigeración a -70°C para extracción de RNA y el último fragmento se destinó para extracción de DNA, misma que se llevó a cabo tal como se describe a continuación.

Digestión del tejido

Cada fragmento de la pieza quirúrgica utilizado para extracción de DNA se colocó primero en 400 µl de una solución de proteinasa K con una concentración de 16.5 mg/ml y se mantuvo en incubación durante una noche a 42°C.

Extracción de ADN

Una vez digerido el tejido se centrifugan las muestras a 6000 rpm durante 5 minutos para

separar los restos de tejido que puedan quedar sin digerir. Posteriormente, se recupera el sobrenadante y se agregan 500 μ l de una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en una relación de 25:24:1. Esta mezcla se homogeniza utilizando un vórtex y posteriormente se centrifuga a 14,000 rpm durante 1 minuto. Se observa una separación de fases en donde la fase superior se recupera y se realiza un segundo lavado con la mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico para después centrifugar nuevamente a 14,000 rpm durante 1 minuto.

Finalmente se recupera la fase superior y se añade 1 ml de etanol absoluto frío para colocarse en hielo seco durante 1 hora. Al término de la hora, las muestras se centrifugan a 14,000 rpm durante 5 minutos y a una temperatura de 4°C para finalmente decantar las muestras y dejar secar la pastilla obtenida a temperatura ambiente. Una vez seca, la pastilla se resuspende en 50 o 100 μ l de agua ultrapura, dependiendo del tamaño de la pastilla. Posterior a la extracción cada muestra de DNA se cuantificó utilizando un equipo NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se prepararon alícuotas de 50 ng/ μ l que se almacenaron a -20 °C.

Genotipificación

Las muestras de DNA fueron enviadas a la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) en Lyon, Francia, para ser analizadas. Para esto se utilizó la técnica *Type-Specific E7 Polymerase Chain Reaction bead-based Multiplex Assay*, que consiste en la utilización de un cocktail de 21 juegos de oligos (tipos de VPH: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82) que amplifican un fragmento del gen E7. Los productos de PCR obtenidos se hibridizan con perlas unidas a sondas específicas para cada tipo viral y a biotina para posteriormente incubarse con estreptavidina y leer su fluorescencia en un equipo Luminex 100 IS (Luminex Corporation) [91]. El análisis incluye oligonucleótidos que amplifican el gen β -globina, que el sistema utiliza como control para la integridad del DNA. Aquellas muestras que no mostraron amplificación de β -globina fueron descartadas del estudio.

Extracción y purificación de RNA

Para la extracción se utilizaron las muestras de tejido mantenidas a -70°C, haciendo uso del kit comercial PowerLyzer UltraClean Tissue & Cells RNA Isolation Kit (MO BIO), de acuerdo con el protocolo descrito por el proveedor. Posteriormente, se cuantificaron con el

equipo NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se tomaron 100 ng del RNA para incubarse con DNAsa1 y así eliminar cualquier posible contaminación con DNA.

Síntesis de cDNA

Con el RNA que se purificó se procedió a sintetizar cDNA utilizando el RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Este cDNA obtenido se envió de igual manera al IARC, en Lyon, Francia, para su análisis.

Actividad transcripcional por PCR

Para analizar la actividad transcripcional del promotor temprano de los genotipos de VPH de alto riesgo se utilizó la técnica de E6*I mRNA de VPH tipo-específico, que amplifica transcritos virales de 20 genotipos de alto riesgo de VPH, partiendo del cDNA sintetizado. El ensayo amplifica un fragmento de VPH de 65-75 pb y 81 pb de Ubiquitina C, como control celular [92].

Inmunohistoquímica

Los fragmentos de la pieza quirúrgica resguardados en la solución de formalina al 10% fueron posteriormente embebidos en parafina y se realizaron cortes histológicos de 4 µm de espesor. Cada laminilla se procesó de acuerdo con el siguiente protocolo.

Se realizan 3 lavados de xilol, cada uno de 5 minutos para posteriormente colocar las laminillas en lavados de etanol al 100, 96 y 70 %, siendo cada lavado de etanol de una duración de 5 minutos. Posteriormente, se realizó un lavado con agua destilada durante 5 minutos y se procedió a hervir las laminillas en un amortiguador de citrato de sodio (25mM; pH = 6.2) durante 20 minutos en el microondas. Posteriormente se desplaza el amortiguador lentamente con agua corriente hasta que el agua alcance la temperatura ambiente. Posteriormente, se cubren las laminillas con peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol durante 5 minutos para después enjuagar con agua destilada durante el mismo tiempo. A continuación, se cubren las laminillas con suero fetal bovino al 10 % en PBS y se deja reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiran las laminillas del suero y se cubren con anticuerpo primario (1/100) para dejar incubar durante toda la noche a 4°C. Como anticuerpo primario se utilizó el HPV Cocktail Broad Spectrum (HPV-1, 6, 11, 16, 18 and 31) de BIOCARE.

Pasado el tiempo de incubación se retiran las laminillas del anticuerpo primario, se realizan 3 lavados en PBS, cada uno de 5 minutos y se adiciona el anticuerpo secundario (1/250) anti-ratón acoplado a HRP (DakoCytomation Inc., CA, USA) en las laminillas, que se colocan en una cámara húmeda para incubarse durante 2 horas a 37°C. Después de la incubación se repiten los lavados con PBS y se añade DAB manteniéndose en oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realiza un lavado con PBS y se hace una contratinción con hematoxilina durante 1 minuto. Para mejorar la tinción se coloca hidróxido de amonio (0.084 %) hasta que se observe una coloración azul en los cortes, para proceder a lavar con agua destilada y dejar secar. Finalmente, una vez que las laminillas están secas, se coloca medio de montaje y se dejan secar toda la noche.

Resultados y discusión

Genotipificación

De las 201 muestras recolectadas, 4 se utilizaron para verificar el método de conservación de DNA más adecuado y se eliminaron del estudio ya que todo el material se utilizó en las pruebas. Una muestra más se eliminó debido a que la pieza quirúrgica no era lo suficientemente grande para proporcionar material para todas las pruebas. Las 196 muestras restantes se analizaron mediante el ensayo multiplex (*Type-Specific E7 Polymerase Chain Reaction bead-based Multiplex Assay*) como se describió anteriormente. Si bien la genotipificación usando como blanco un segmento del gen L1 es la más común, en nuestro estudio se consideró utilizar a E7 ya que tratamos con epitelio glandular endocervical y el cáncer derivado de éste (adenocarcinoma) cuenta con un 100% de integración del DNA de VPH al del hospedero, perdiendo al gen L1 [93]. En la literatura existe el reporte del caso de una mujer de 36 años cuyo pap smers reveló un diagnóstico únicamente de células glandulares atípicas y consecuentes pruebas para identificar VPH por PCR mostraron negatividad analizando al gen L1 y positividad con E6/E7 [94].

Como resultado, se obtuvo que 39 muestras no mostraron amplificación para β -globina, por lo que se eliminaron del estudio, restando 157 muestras, 30 de IVPH y 127 de sólo eversión glandular (EG), cuyos genotipos presentes se muestran en la Tabla 1. Es importante mencionar que el ensayo multiplex también brinda una medida semi cuantitativa del número de copias del DNA blanco presentes en las muestras analizadas, pero al ser semi-cuantitativa se utilizó solo como referencia en el diseño de los experimentos.

De la Tabla 1 observamos que las pacientes positivas a cualquier tipo de VPH representan el 52.75% de la población de estudio, corroborando la alta prevalencia de VPH en eversión glandular previamente reportada por nuestro grupo de investigación [87], [88]. De este porcentaje, el 38.58% corresponde a infecciones simples dónde el 18.36% son infecciones por VPH de bajo riesgo y el 81.63% es representado por tipos de VPH de alto riesgo, resultado que concuerda con reportes previos de la literatura [95].

Tabla 1. Genotipificación de VPH en eversión glandular. Se muestran los genotipos encontrados en el grupo EG, identificando infecciones simples y múltiples, así como las infecciones simples por tipos virales de alto y bajo riesgo.

Genotipo de VPH	Total (n)	(%)
Negativo	60	47.24
Cualquier tipo	67	52.75
Infección simple	49	38.58
Alto riesgo	40	81.63
16	12	24.48
18	6	12.24
31	7	14.28
39	3	6.12
51	6	12.24
56	2	4.08
58	1	2.04
59	1	2.04
66	1	2.04
68	1	2.04
Bajo riesgo	9	18.36
6	1	2.04
11	2	4.08
26	3	6.12
53	2	4.08
61	1	2.04
Infección múltiple	18	14.17

Dentro de los genotipos de alto riesgo encontrados, los de mayor prevalencia son el VPH-16, seguido por el VPH-31 y VPH-18, representando el 24.48, 14.28 y 12.24% respectivamente. Dichos resultados concuerdan con diferentes reportes de la literatura que colocan al VPH-16 como el de mayor predominancia a nivel local [96]–[98] y mundial[99], [100], y a VPH18 y 31 dentro de los tres genotipos de mayor incidencia; sin embargo es necesario notar que dichos estudios consideran en su mayoría muestras tomadas de exocérvix, por lo que podrían no ser representativas de la población que estudiamos.

Para comparar, en este caso recurrimos a los reportes de VPH en tejido glandular endocervical que hay en la literatura, que corresponden a tejido ya sea de adenocarcinoma in situ o lesiones glandulares. Anteriormente en nuestro grupo de investigación se había encontrado que el VPH predominante en ectopia cervical era VPH-18, información respaldada por otros reportes que muestran prevalencia de este tipo de VPH en adenocarcinoma in situ, adenocarcinoma microinvasor y diversas lesiones glandulares sugiriendo una predilección de VPH-18 por este epitelio [101]. En contraste con esta

información nuestros hallazgos colocan al VPH-16 como el de mayor incidencia, encontrando también literatura que concuerda con este resultado [102], [103].

Retomando a las infecciones múltiples, esta vez analizando los genotipos presentes que se muestran en la *Tabla 2*, observamos que nuevamente el VPH16 es el de mayor prevalencia, presentándose en 10 de las 18 coinfecciones encontradas (55.55%) y en todos los casos se muestra como el genotipo de mayor abundancia de acuerdo con el número de copias reportado con el análisis Multiplex.

Seguido a VPH-16 tenemos a VPH-31, presente en 3 de 18 muestras, representando el 16.66%, mientras que el resto de las coinfecciones se presentó de manera única.

Tabla 2. Genotipos de VPH en infecciones múltiples. Se presentan los genotipos encontrados en tejido proveniente de eversión glandular. El genotipo predominante fue obtenido mediante el ensayo multiplex.

Infecciones múltiples	
VPH predominante	Co-infección
11	39
16	18,31
	31, 45, 58
	31, 45, 53, 59
	11
	6, 59
	31, 59
	66
	18
	53
18	6
31	35, 39, 56, 59, 68, 73, 53
	52, 53
	39
39	26
52	58
58	51, 53, 66
68	45, 51, 52, 53, 58

Los reportes de la literatura muestran a los tipos de VPH-33, 35, 45, 52, 53, 81 y 83 como los encontrados en co-infección con mayor frecuencia [104], [105], mientras que VPH-16, 58 y 66 tienden mayormente a encontrarse en infección simple [105], lo que difiere de nuestros resultados ya que VPH-16 fue el genotipo mayormente representado en infecciones múltiples.

De esta forma encontramos que en eversión glandular la prevalencia de VPH es elevada y más aún, dicha prevalencia se compone mayormente de genotipos de alto riesgo, siendo esto preocupante ya que la presencia de dichos genotipos se encuentra ligada al desarrollo de CaCu.

Análisis de factores de riesgo

Una vez realizada la genotipificación, analizamos los factores de riesgo comúnmente asociados a la infección por VPH como la edad, el número de parejas sexuales, el número de embarazos y el uso de anticonceptivos hormonales en la población EG. Como resultado y de acuerdo con la *Tabla 3* obtuvimos que, al contrastar el grupo de VPH negativo contra VPH positivo, únicamente el número de parejas sexuales mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.031$), por lo que si comparamos los valores promedio de ambos grupos se distingue que las pacientes positivas a VPH tienen un número de parejas sexuales significativamente mayor que las pacientes del grupo negativo a VPH. Reportes anteriores de la literatura coinciden con este resultado [106]–[109] y se considera que el número de parejas sexuales es un factor de riesgo de extrema relevancia ya que la exposición al virus es mayor, no solo por la influencia de este factor de manera directa, sino porque el comportamiento sexual de sus parejas también influye y cuentan como contactos indirectos para el individuo analizado.

Tabla 3. Evaluación de los factores de riesgo asociados a la infección por VPH. La clasificación de “Positivo” comprende infecciones simples y múltiples mientras que en las abreviaturas “IS” se clasifican solo las infecciones simples y en “IM” las infecciones múltiples. En las categorías de “Alto riesgo” y “Bajo riesgo” se consideran únicamente las infecciones simples por los tipos virales correspondientes a la categoría.

Genotipo VPH	Edad	N° parejas sexuales	Embarazos	Anticonceptivos hormonales
Negativo	33.2	1.8	2.2	9/60
Positivo	31.4(0.069)	2.24(0.031)	2.18(0.722)	4/67(0.094)
IS	30.6 (0.025)	2.4 (0.152)	2 (0.351)	2/49 (0.180)
Alto riesgo	30.9 (0.053)	2.0 (0.193)	2 (0.421)	2/40 (0.308)
Bajo riesgo	29.4 (0.097)	2.1 (0.358)	1.9 (0.492)	0 /9 (0.584)
IM	33.6 (0.920)	2.8 (0.010)	2.7 (0.347)	2/18 (1.00)

Posteriormente separamos el grupo de pacientes positivas a VPH en función de la multiplicidad de la infección, por lo que se analizó si existían diferencias significativas entre

las pacientes con infecciones simples, múltiples y el grupo negativo. En el caso de las infecciones simples, comparando los valores promedio y de acuerdo con el valor p observado ($p=0.025$), las pacientes con infecciones simples son más jóvenes que aquellas en el grupo negativo y dicha diferencia es significativa.

Por otro lado, para el grupo de infecciones múltiples únicamente el número de parejas sexuales presentó una diferencia significativa ($p=0.010$), por lo que podemos concluir que las pacientes con infecciones múltiples tienen un número de parejas sexuales significativamente mayor que el grupo negativo.

Los resultados obtenidos para el factor de riesgo de edad concuerdan con la literatura ya que ésta ha sido reportada como un factor de riesgo para la infección por cualquier genotipo de VPH [108], [110], [111]. En los casos en los que se han comparado infecciones simples contra múltiples como en el estudio realizado por Rousseau y colaboradores se ha encontrado que las infecciones múltiples se presentan con mayor frecuencia en mujeres jóvenes (menores de 25 años) y con un mayor número de parejas sexuales que en aquellas con infecciones simples [112], siendo éstas diferencias significativas.

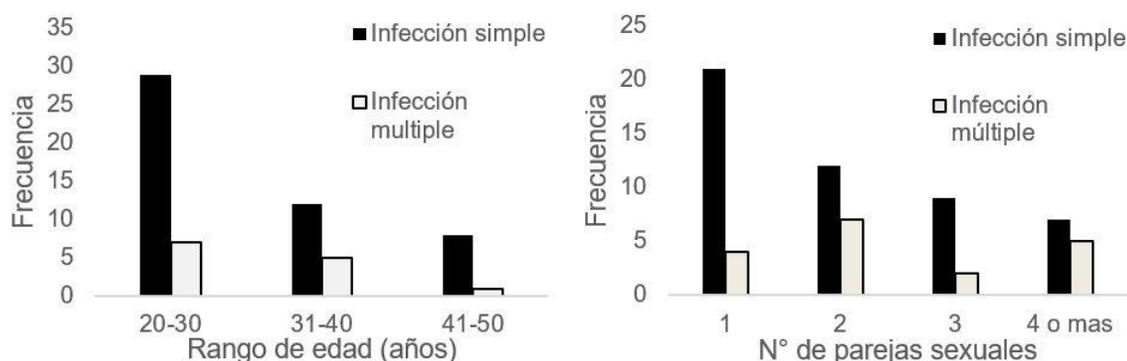


Figura 10. Edad y número de parejas sexuales en pacientes con VPH. Se observa la comparación entre aquellas pacientes con infección simple y aquellas con infecciones múltiples.

Nuestro análisis compara ambos grupos contra el grupo control de pacientes negativas a VPH, mientras que en el estudio de Rousseau antes mencionado se realizó la comparación entre las infecciones simples y las múltiples, por lo que se procedió a realizar dicha comparativa. Como se observa en la Figura 11, las pacientes con infecciones simples siguen la misma tendencia tanto en edad como en el número de parejas sexuales, encontrando que la mayoría de las pacientes de este grupo se encuentran representadas en el rango de 20-30 años y con un número de parejas sexuales de 1-2. Por otro lado, en

cuanto a las infecciones múltiples, éstas siguen la misma tendencia que las simples en cuestión al rango de edad, ya que la mayoría está en el grupo de 20-30 años, sin embargo, en el número de parejas sexuales la tendencia se pierde y se observa variación. Por este motivo se realizó el análisis estadístico correspondiente cuyos resultados se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de factores de riesgo entre las infecciones múltiples y las simples. Se presentan los valores promedio en cada factor de riesgo evaluado y el valor p obtenido mediante la prueba U-Mann Whitney donde se considera significativo cualquier valor de $P < 0.05$.

Tipo de infección	Edad/ valor promedio	#Parejas sexuales /valor promedio	Embarazos/ valor promedio
IS	30.63	2.04	2.00
IM	33.56	2.78	2.67
Valor p	0.266	0.116	0.165

Como se puede observar, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las pacientes con infecciones múltiples y aquellas con infecciones simples de acuerdo con los factores evaluados. Una posibilidad es que el tamaño de nuestra población ($n=67$) no refleje adecuadamente la influencia de estos factores de riesgo, ya que los otros estudios publicados cuentan con poblaciones de entre 2000 y 5000 participantes [95], [112].

Finalmente se analizó si existía diferencia alguna entre las pacientes que presentaron una infección simple por algún tipo de VPH de alto o de bajo riesgo. Para ambos grupos no se observó diferencia significativa para ninguno de los factores de riesgo evaluados, por lo que se concluye que el número de embarazos, de parejas sexuales y la edad no están particularmente asociados a contraer un tipo de VPH de alto o de bajo riesgo.

Actividad transcripcional de VPH en eversión glandular

Como se describió anteriormente, el proceso mediante el cual el VPH lleva a la carcinogénesis del epitelio depende en gran manera de la participación en conjunto de las oncoproteínas E6 y E7. En los VPH de alto riesgo un solo promotor dirige la transcripción de los genes E6 y E7 (p_{97} para VPH-16), produciendo un transcrito bicistrónico que posteriormente por medio de splicing alternativo, deja fuera un intrón que se encuentra entre el marco de lectura de E6, generando el RNA mensajero llamado E6*1, el transcrito más abundante y característico únicamente de los VPH de alto riesgo[113].

Considerando al transcrito E6*I como un indicador de la actividad transcripcional de VPH de alto riesgo y dado que estos tipos virales fueron los de mayor prevalencia encontrados en el presente estudio se procedió a realizar un análisis por RT-PCR de estos transcritos. 56 muestras fueron seleccionadas de entre aquellas que mostraran positividad a los genotipos de mayor prevalencia, VPH-16, 31 y 18, considerando para este caso a infecciones simples como múltiples, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Actividad Transcripcional de VPH. Evaluación de la actividad transcripcional de VPH de alto riesgo en muestras de ectopia cervical mediante RT-PCR.

	Genotipo de VPH			
	Negativo	16	18	31
N° de muestras	10	25	9	11
E6*I (+)	0	0	0	1

Como se puede observar, no fue posible identificar actividad transcripcional alguna para las muestras con VPH-16 y/o 18, mientras que sólo una muestra con VPH-31 mostró transcritos. Las posibles implicaciones de la actividad transcripcional de VPH-31 en epitelio glandular se ven reflejadas en la prevalencia de éste en las patologías del endocérvix relacionadas con la presencia de VPH. Como se mencionó anteriormente, los tipos de VPH encontrados con mayor frecuencia en adenocarcinoma y/o lesiones glandulares son el 16 y 18 [114]–[116] y a su vez son los que presentan mayor persistencia y correlación con el desarrollo de lesiones glandulares [117] mientras que el VPH-31 se reporta con una baja asociación hacia la progresión o el desarrollo de una lesión glandular [115].

De esta forma, los resultados mostrados sugieren que el VPH no tiene actividad transcripcional en el epitelio glandular del endocérvix presente en eversión glandular, lo que puede explicarse al tomar en cuenta que el epitelio glandular se considera como no permisivo, al no presentar el programa de diferenciación que el virus requiere para realizar su ciclo viral.

Presencia de L1 por IHQ

Ya que los resultados antes mencionados sugieren que no hay actividad transcripcional de VPH en este epitelio, procedimos a comprobar estos hallazgos evaluando la presencia de L1, la proteína mayor de la cápside viral por inmunohistoquímica (IHQ).

La presencia de L1 por IHQ en tejido epitelial es considerada como un indicador de una infección productiva y se ha observado que se relaciona de manera inversa con la progresión de las lesiones epiteliales, estando presente en aquellas de bajo grado para finalmente no encontrarse en tejido tumoral tanto de carcinoma de células escamosas como de adenocarcinoma de cérvix [118]–[122].

Por esta razón, para corroborar que no existen procesos de infección productiva en el epitelio de eversión glandular se realizó la IHQ para L1 a partir de cortes fijados con formalina y embebidos en parafina utilizando el HPV Cocktail Broad Spectrum (BIOCARE) que contiene anticuerpos contra L1 de VPH 1, 6, 11, 16, 18 y 31. En total se seleccionaron 54 muestras para realizar cortes histológicos, de los cuales 45 corresponden a muestras positivas a alguno de los tipos de VPH incluidos en el coctel, tomando en cuenta infecciones simples y múltiples, además de 5 controles negativos a VPH. El grupo control IVPH se analizó con hematoxilina/eosina para identificar fragmentos de tejido escamoso que pudiesen servir como control positivo para la tinción de L1, encontrando que sólo 4 muestras de este grupo presentaban tejido escamoso, mismas que se incluyeron en el estudio.

Como resultado se encontró que 9 cortes del grupo EG presentaban tejido escamoso, sumando un total de 13 muestras con este tipo de tejido, de las cuáles 10 mostraron tinción en citoplasma. En la *Figura 12* se muestran imágenes representativas de las tinciones en citoplasma observadas, comparadas con el tejido glandular presente en las mismas muestras. En todos los casos no se observó tinción alguna en epitelio glandular columnar.

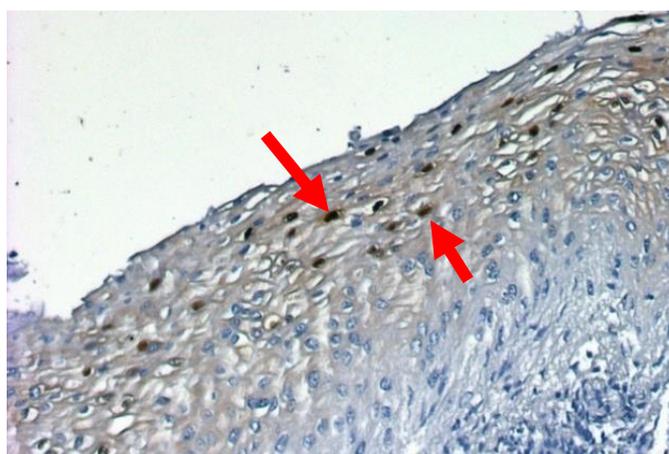


Figura 11. Infección productiva de VPH en epitelio escamoso estratificado. Las flechas señalan los núcleos teñidos de color café que denotan la presencia de la proteína L1 en el núcleo celular, característica de una infección productiva.

Dentro de las muestras que mostraron tinción, únicamente se observó positividad nuclear en una muestra del grupo control IVPH, misma que se muestra en la Figura 11

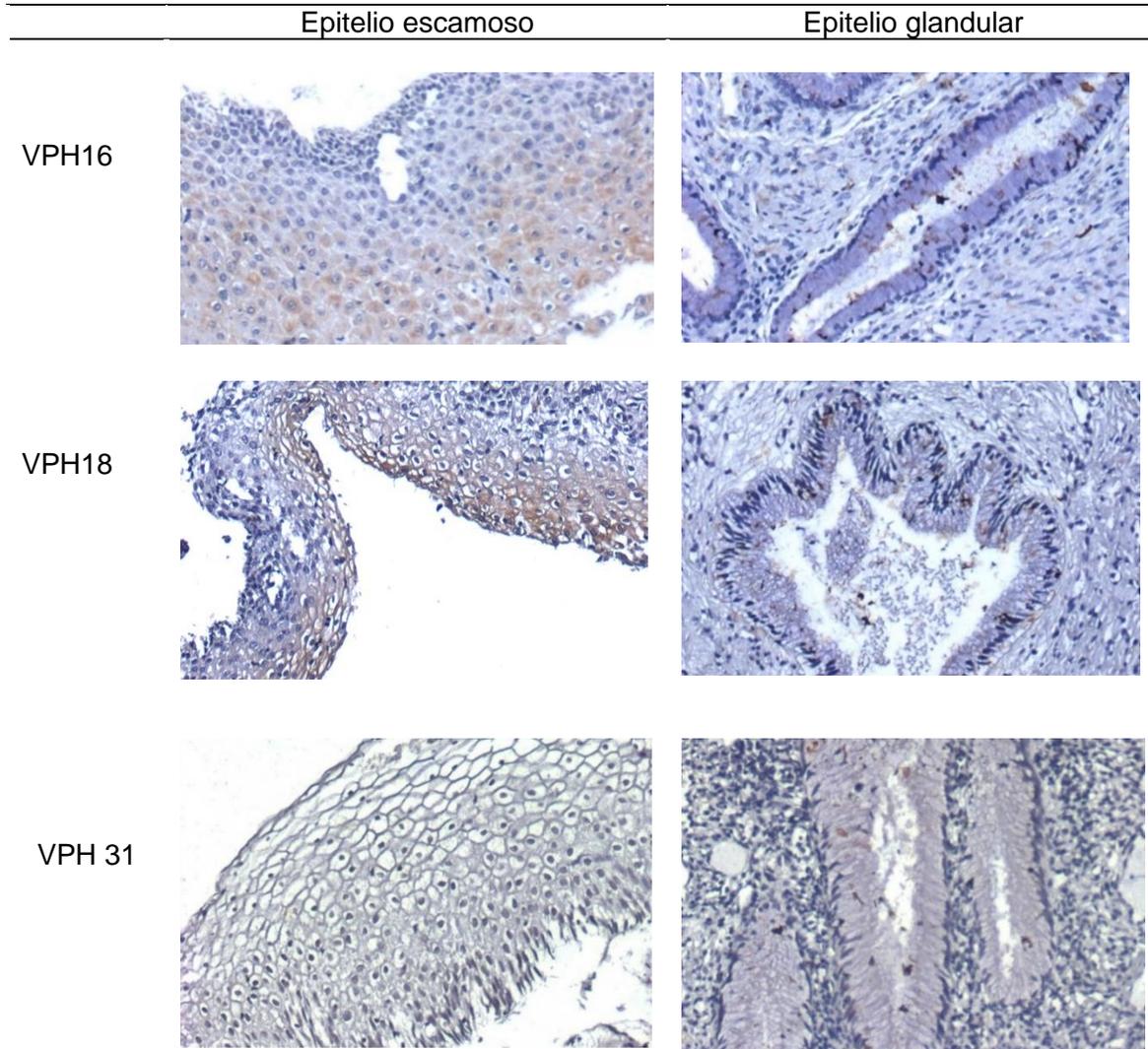


Figura 12. Ausencia de infección productiva en epitelio glandular endocervical y epitelio escamoso estratificado. Se observa la falta de tinción nuclear tanto en epitelio escamoso como en epitelio glandular endocervical. Se muestran figuras representativas de muestras positivas a VPH16, 18 y 31 por análisis de DNA.

Continuando con el análisis de la Figura 12, tanto la muestra positiva a VPH16, como la positiva a VPH18 habían sido diagnosticadas como EG y sin indicios de IVPH, pero como observamos en las imágenes ambas presentaron tejido escamoso con tinción para L1 en citoplasma, mientras que en la zona dónde encontramos las formaciones glandulares del

epitelio columnar no se observó tinción. Aunque la tinción nuclear positiva es la que se considera mayormente como indicador de un proceso activo, ya que durante el proceso de empaquetamiento de DNA viral L1 se transloca al núcleo [123], se ha observado que en NIC I existe una fuerte presencia de L1 con localización nuclear, mientras que en NIC II se observa principalmente tinción difusa en el citoplasma y para NIC III no se muestra tinción [124]. En nuestros resultados predominó la tinción difusa del citoplasma en epitelio escamoso, que corresponde con el patrón que puede encontrarse en una NIC II, sin embargo los cortes histológicos no muestran otras características típicas de una NIC II, como lo son núcleos atípicamente grandes y figuras mitóticas a lo largo de las capas bajas del epitelio [125]. El diagnóstico de una NIC I o II suele ser retador ya que el embarazo, la inflamación o bien los cambios hormonales pueden mimetizar características que se toman en cuenta para la clasificación de las NIC y aún en diagnósticos realizados por histopatólogos expertos existen discrepancias considerables [126]–[128], de forma que nuestros resultados también deben interpretarse con cuidado.

Por otro lado, tenemos también a la muestra positiva a DNA de VPH-31 por análisis de DNA, que no presenta tinción positiva en ninguno de los epitelios presentes en el corte histológico. La tinción negativa a L1 en el epitelio glandular corrobora el supuesto de que, aunque hay presencia del virus en este epitelio, no existe un proceso de infección productiva, tal y como los resultados de la transcripción sugieren también.

Recapitulando hasta este punto, los resultados indican que, aunque hay presencia de VPH en eversión glandular, no hay actividad transcripcional aparente ya que no se encontraron transcritos de E6*1 y de acuerdo con la IHQ para L1, tampoco hay indicios de que se esté produciendo una infección productiva, sin embargo, los hallazgos de histología requieren de mayor estudio. En la literatura se ha reportado que p16^{INK4a} y ki67 (también marcadores subrogados de la presencia de E6 y E7) son una herramienta valiosa en la evaluación de lesiones del cérvix así como otras patologías asociadas a VPH [129], [130]. Particularmente p16^{INK4a} ha mostrado una tendencia a estar presente en lesiones NIC I que progresan a NIC II y NIC III [131], por lo que con el fin de corroborar los resultados obtenidos de la IHQ para L1 de que no existe actividad del virus en este epitelio, además de obtener información sobre la posible histopatología de los cortes analizados, se realizó la evaluación de los marcadores de proliferación p16^{INK4a} y ki67, también por IHQ.

Evaluación de los marcadores de proliferación ki67 y p16^{INK4a} por IHQ

Para este estudio se analizó el mismo grupo de muestras utilizado para la determinación de L1.

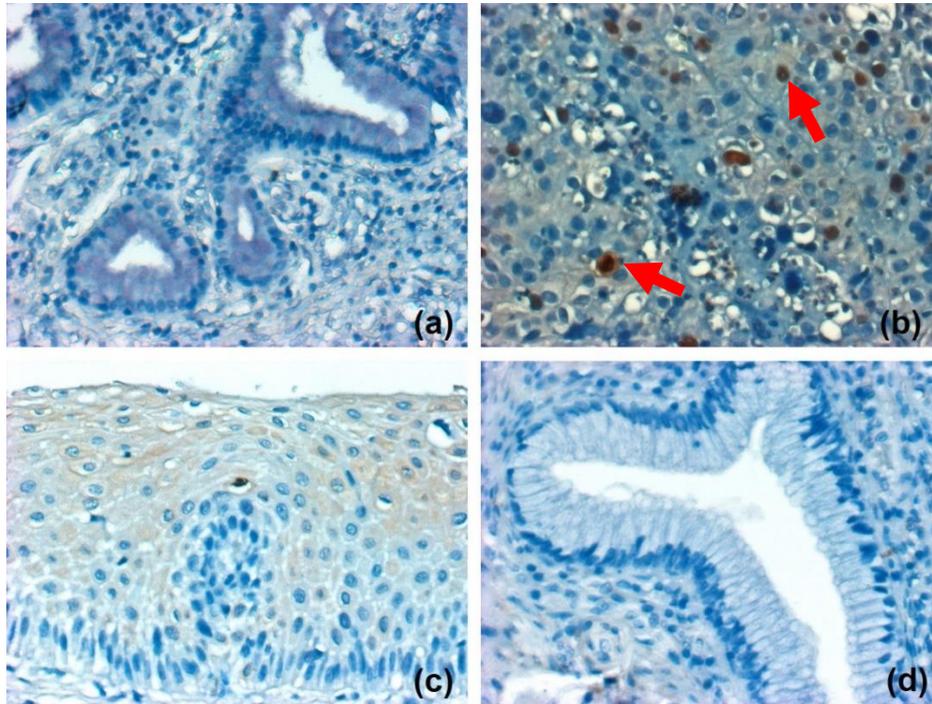


Figura 13. Ausencia del marcador de proliferación celular ki67 en tejido de ectopia cervical. Se observa en (a) el control negativo de una muestra negativa a DNA de VPH, (b) el control positivo correspondiente a una muestra de CaCu en dónde las flechas señalan la tinción positiva en el núcleo. (c) Muestra epitelio escamoso de una muestra positiva a VPH comparado con (d) el epitelio columnar glandular de la misma muestra.

Los resultados mostrados en la Figura 13 son imágenes representativas de la evaluación de ki67 en eversión glandular y epitelio escamoso. La subfigura (a) nos muestra una tinción negativa en el epitelio columnar glandular de una paciente VPH negativa mientras que la subfigura (b) muestra una tinción positiva de ki67 en un corte histológico perteneciente a una paciente control diagnosticada con CaCu. En las subfiguras (c) y (d) se observa al epitelio escamoso y columnar de una muestra positiva a VPH, dónde únicamente el epitelio escamoso muestra positividad a ki67 mayormente difusa en citoplasma

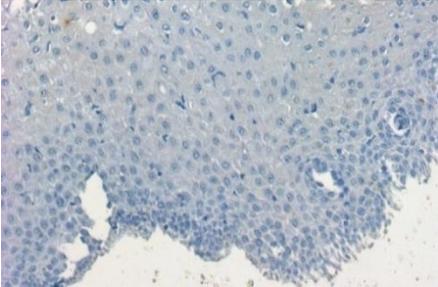
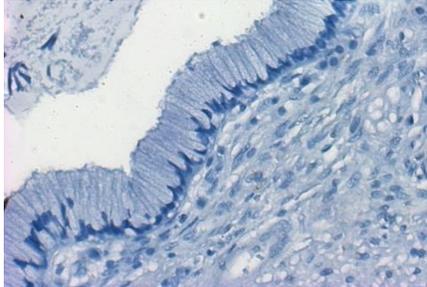
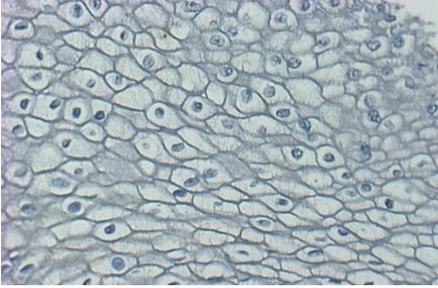
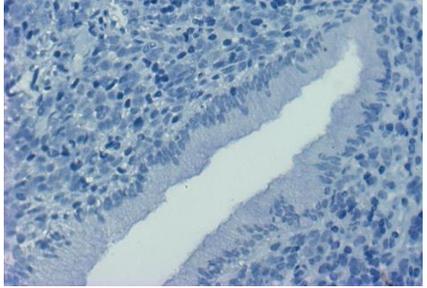
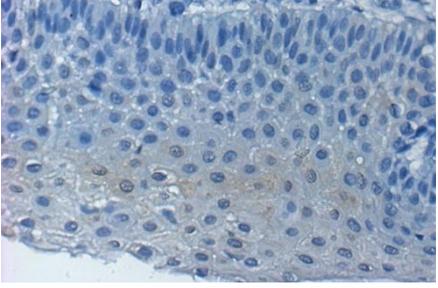
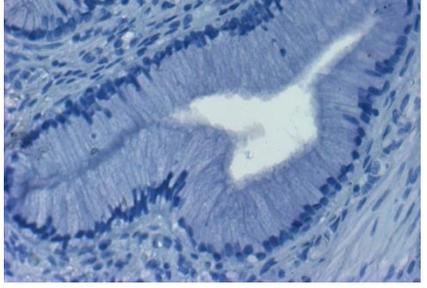
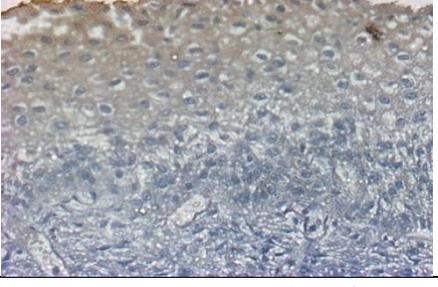
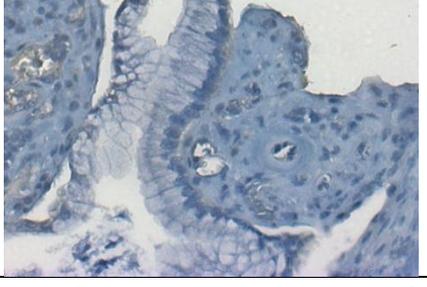
N° muestra	Epitelio escamoso	Epitelio glandular
55		
58		
187		
60		

Figura 14. Presencia del marcador de proliferación celular p16INK4a en epitelio escamoso estratificado y ausencia en epitelio glandular endocervical. Se muestra la comparación de la tinción citoplásmica observada para epitelio escamoso (primera columna) y la nula tinción en epitelio glandular.

Para este marcador se observó la misma tendencia que para L1, ya que las muestras con positividad en tejido escamoso a L1 fueron las mismas que presentaron positividad a ki67 y de igual forma no se observó positividad alguna en epitelio columnar. Para complementar estos resultados se analizó al marcador p16^{INK4a}.

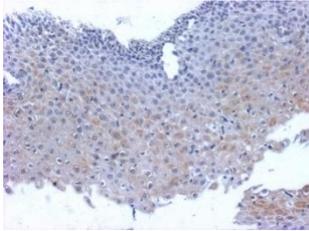
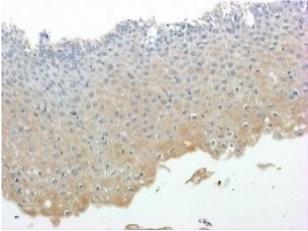
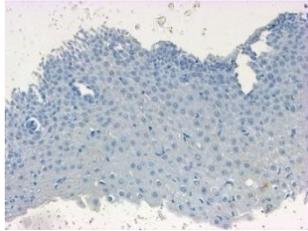
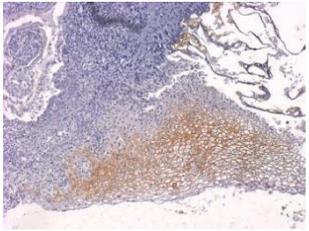
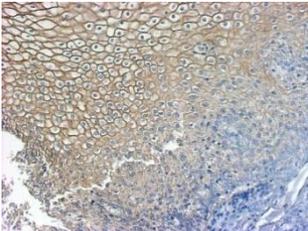
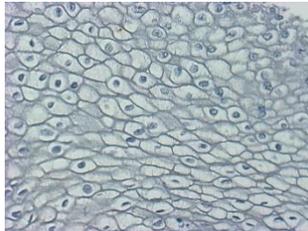
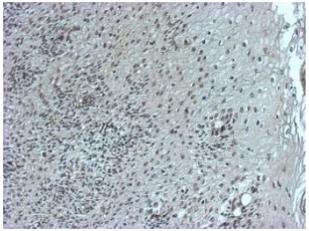
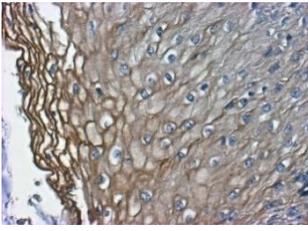
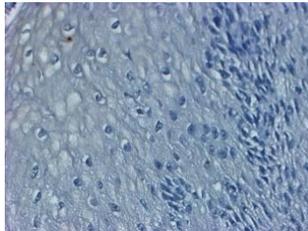
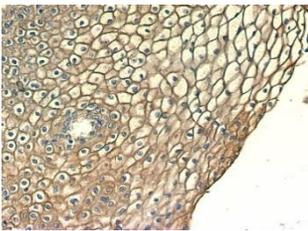
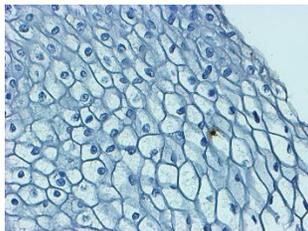
N° de muestra	L1	Ki67	p16 ^{INK4a}
55			
58			
137			
191			

Figura 15. Presencia de L1, ki67 y p16^{INK4a} en epitelio escamoso estratificado. Se muestra la comparación entre los resultados obtenidos en epitelio escamoso para los 3 marcadores analizados. Las muestras 55 y 58 corresponden a pacientes positivas mediante análisis de DNA a VPH-16, mientras que la muestra 137 es positiva a VPH-16 y VPH-18 y la muestra 191 es positiva a VPH-11 y VPH-39.

En el caso de p16^{INK4a}, en la Figura 14 se observan imágenes representativas de muestras que presentaron epitelio escamoso y glandular para realizar el comparativo al igual que en los marcadores anteriores. Como resultado observamos el ejemplo de dos muestras con tinción positiva a p16^{INK4a} en epitelio escamoso (187 y 60) y dos negativas (55 y 58), pero para ningún caso se mostró positividad en epitelio columnar glandular, al igual que como se observó en los resultados para L1 y ki67.

Los resultados de p16^{INK4a} difieren de los obtenidos para ki67 ya que 4 muestras que fueron positivas a ki67 se mostraron negativas a p16^{INK4a}, como se muestra en la [Figura 15](#) en dónde también se muestra la comparativa contra los resultados de L1.

Estos resultados se respaldan en la literatura ya que se sabe que mientras que ki67 es un marcador de proliferación, su asociación con las lesiones que tienden a progresar es baja [125], por lo que p16^{INK4} se utiliza para filtrar esos casos de forma que mostrar positividad a ki67 y negatividad a p16^{INK4} es un evento común. Mientras que L1 indica presencia de dicha proteína viral en estos epitelios, al no tratarse de positividad nuclear no se puede considerar que exista una infección productiva. El marcador ki67 nos dice si hay proliferación celular, aunque la causa de esta proliferación no es únicamente la presencia de VPH ya que como se mencionó anteriormente, la inflamación también tiene influencia en este marcador.

Para p16^{INK4} se ha observado que tiene una menor tendencia a mostrar positividad en muestras en las que no hay presencia de VPH [132], además de relacionarse con una tendencia a la progresión hacia una lesión epitelial, ya sea glandular o escamosa [131]. Para aquellas muestras positivas a ki67 y L1 de VPH, pero negativas a p16^{INK4} se sugiere que existe presencia del virus y de proliferación, pero no se trata aun de alguna lesión epitelial. Para las muestras como la 187 y 60, que muestran positividad a p16^{INK4} de manera difusa en citoplasma, se ha reportado previamente en la literatura que dicho patrón esta fuertemente asociado a la inflamación [133], coincidiendo con los resultados sugeridos por ki67 ya que dichas muestras también muestran positividad a este marcador.

Estos resultados indican que, aunque en el epitelio de eversión glandular no parece haber alteraciones, en el epitelio escamoso adyacente podría haber presencia de procesos inflamatorios.

Seguimiento de las pacientes

Para identificar la relevancia clínica de nuestros hallazgos, así como la efectividad del tratamiento dado a las pacientes, al cabo de un año se regresó a la clínica para recolectar datos de las pacientes en el estudio. Dichos resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Seguimiento de pacientes. En la tabla se presenta el número de pacientes que corresponde a cada categoría mientras que entre paréntesis se observa el porcentaje del total al que corresponden.

	Infección (N =147) N (%)				Alteraciones Inflamatorias		Reincidencia de EG	
	Ninguna	Fúngica	Bacteriana	Ambas	Si	No	Si	No
VPH (+)	40	15	18	5	12	66	2	76
VPH (-)	35	16	15	3	9	60	0	69
Total	75 (51.02)	31 (21.08)	33 (22.44)	8 (5.44)	21 (14.28)	126 (85.71)	2 (1.36)	145 (98.63)
Valor p	0.899				0.686		0.180	

En el análisis se consideraron ambos grupos (IVPH y EG). De las 157 pacientes que se introdujeron en el estudio, se descartó una paciente más, ya que su historial no pudo ser encontrado al momento en el que se regresó a la clínica. De las 156 pacientes restantes, 9 no volvieron a la clínica, por lo que también se retiraron del análisis estadístico, conservando 147 pacientes.

Como se observa en la Tabla 6, en las visitas posteriores a su tratamiento el 48.96 % de las pacientes en el estudio mostraron la presencia de infecciones ya sea de origen fúngico, bacteriano o ambos, sin embargo, de acuerdo con el valor p obtenido mediante la prueba de X^2 ($X^2 = 0.899$) no se encontró asociación entre el grupo de VPH positivo o negativo con la presencia de infecciones.

Lo mismo ocurre para la asociación entre nuestros grupos positivos y negativos a VPH y la presencia de alteraciones inflamatorias o la reincidencia de EG, cuyos valores de X^2 son 0.686 y 0.180, de forma que se descarta cualquier asociación entre las variables. Estos resultados también nos hablan de la efectividad de la electrocirugía para tratar la EG, ya que únicamente dos pacientes mostraron reincidencia de tejido ectópico durante el transcurso del primer año posterior al tratamiento. La escisión electroquirúrgica es utilizada comúnmente para tratar NIC, reportando un porcentaje de reparación de la lesión del 5 al 15% [134], destacando que dicha reincidencia está fuertemente asociada a la presencia de

VPH de alto riesgo en las lesiones previas al tratamiento [135]. Para la persistencia de VPH posterior a un tratamiento por escisión electroquirúrgica se reporta un 15.3% (a un año del procedimiento) [136], por lo que también es importante destacar que en nuestro estudio el seguimiento se realizó con observaciones colposcópicas y no se realizó ninguna prueba para determinar la presencia de VPH.

A un año del tratamiento se observa que todas pacientes muestran adecuada cicatrización del cérvix y se reporta una reincidencia del 1.36% en eversión glandular, por lo que se puede considerar que la escisión de tejido ectópico por electrocirugía es eficiente para tratar la eversión glandular.

Conclusiones

En conjunto nuestros resultados indican que si bien, hay presencia de VPH en tejido proveniente de eversión glandular, siendo los genotipos de alto riesgo los que predominan, no existe un proceso de infección productiva en este epitelio, ya que no se observó presencia de transcritos de E6*1, ni se encontró tinción positiva en epitelio glandular columnar a L1 de VPH o a los marcadores de proliferación p16^{INK4a} y ki67. Para estos 3 marcadores sólo se presentó tinción en epitelio escamoso y por el patrón observado (difuso en citoplasma) se sugiere la presencia de procesos inflamatorios en dicho epitelio.

De acuerdo con el seguimiento realizado a las pacientes después de un año del tratamiento, la reincidencia de eversión glandular es casi nula y no se observan alteraciones significativas en el cérvix, mostrando una adecuada cicatrización.

Por esta razón se considera que las implicaciones de la presencia del virus en el epitelio columnar glandular del endocérnix son aún desconocidas. Hasta el momento no se cuenta con información sobre la participación del virus en la carcinogénesis de este epitelio y solo se estudia su prevalencia y participación en el mantenimiento de adenocarcinoma endocervical o lesiones glandulares en las que se encuentra DNA viral integrado, pero los mecanismos por los que esto ocurre no se han explorado. Los resultados del presente estudio sugieren que la vía canónica conocida para el desarrollo de carcinogénesis en el epitelio escamoso podría no ser la responsable de este proceso en el epitelio glandular columnar del endocérnix.

Perspectivas

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se sugiere que los siguientes trabajos se orienten a indagar la influencia de la inflamación en este epitelio infectado con VPH. En el presente trabajo y los trabajos previos del grupo de investigación se han concentrado los esfuerzos en identificar la influencia del VPH en el epitelio columnar glandular del endocérnix, pero no se ha explorado la influencia del microambiente de estas células infectadas.

Como los resultados de IHQ sugieren, es posible que se estén presentando procesos inflamatorios en el epitelio escamoso adyacente a la eversión glandular, por lo que se considera que identificar la frecuencia con la que se encuentran presentes estos procesos, así como sus causas, consecuencias y la forma en la que se relacionan con el epitelio columnar infectado por VPH son de vital importancia.

Aunado a esto, para identificar si la infección por VPH presentada en este epitelio es persistente se requiere del análisis de VPH en las pacientes como parte de su seguimiento, y así obtener información sobre la relevancia de la presencia de VPH en eversión glandular, así como evaluar la eficacia de la técnica de escisión por electrocirugía para tratar estos casos.

La información del seguimiento, así como la evaluación de los procesos inflamatorios que ocurren en el microambiente de las células columnares glandulares del endocérnix podrían ayudar a comprender un poco más sobre los procesos que llevan a la carcinogénesis de este epitelio, así como el entender cuál es el papel del VPH en el mismo. La comprensión de dichos mecanismos podría ayudar en un futuro a diseñar técnicas de detección temprana para adenocarcinoma y así lograr disminuir la creciente incidencia de este.

Bibliografía

- [1] L. Bruni *et al.*, “Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report,” *Inf. Cent. HPV Cancer*, no. June, 2019.
- [2] J. V. Spencer, *Deadly disease and epidemics: Cervical Cancer*. Chelsea House Publishers, 2007.
- [3] “The cervix,” *Jo’s cervical cancer trust*, 2016. [Online]. Available: <https://www.jostrust.org.uk/about-cervical-cancer/the-cervix>.
- [4] S. Mehta and P. Sachdeva, *Colposcopy of Female Genital Tract*. Springer Nature, 2017.
- [5] “Colposcopy Digital Atlas.” [Online]. Available: <http://screening.iarc.fr/atlascolpodetail.php?Index=13&e=>. [Accessed: 07-May-2019].
- [6] J. A. Jordan and A. Singer, *The cervix*, Second edi. Blackwell Publishing, 2006.
- [7] G. Dallenbach-hellweg, *Color Atlas of Histopathology of the Cervix uteri*, Second edi. 2006.
- [8] D. L. Jacobson, L. Peralta, N. M. H. Graham, and J. Zenilman, “Histologic development of cervical ectopy: Relationship to reproductive hormones,” *Sex. Transm. Dis.*, vol. 27, no. 5, pp. 252–258, 2000.
- [9] C. D. Blaskewicz, J. Pudney, and D. J. Anderson, “Structure and Function of Intercellular Junctions in Human Cervical and Vaginal Mucosal Epithelia,” vol. 104, no. April, pp. 97–104, 2011.
- [10] J. W. Sellors and R. Sankaranarayanan, “Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. A Beginner’s Manual,” *IARC Press*, 2013.
- [11] E. Gatón and M. D., “The effect of estrogen and gestagen on the mucus production of human endocervical cells : a histochemical study,” *Fertil. Steril.*, vol. 38, no. 5, pp. 580–585, 1982.
- [12] M. Rodriguez, M. V Patel, Z. Shen, J. V Fahey, N. Biswas, and J. Mestecky, *Mucosal Immunity in the Human Female Reproductive Tract*, Fourth Edi. Elsevier.
- [13] J. P. Nott, E. A. Bonney, J. D. Pickering, and N. A. B. Simpson, “The structure and function of the cervix during pregnancy,” *Transl. Res. Anat.*, vol. 2, pp. 1–7, 2016.
- [14] IARC, “Anatomy of the uterine cervix and the transformation zone.”
- [15] V. Giroux and A. K. Rustgi, “Metaplasia: tissue adaptation and precursor to the dysplasia-cancer sequence,” *Nat Rev Cancer*, vol. 17, no. 10, pp. 594–604, 2018.
- [16] P. Greaves, “Female Genital Tract,” in *Histopathology of preclinical toxicity studies*, 2011, pp. 717–779.
- [17] O. Reich, C. Redman, and C. Bergeron, “Defining the Cervical Transformation Zone and Squamocolumnar Junction : Can We Reach a Common Colposcopic and

Histologic Definition ?,” no. 3, pp. 1–6, 2017.

- [18] Globocan. 2018, “Estimated number deaths worldwide, females, all ages,” *International Agency for Research on Cancer*, 2018. [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=1.
- [19] P. A. Cohen, A. Jhingran, A. Oaknin, and L. Denny, “Cervical cancer,” in *The Lancet*, vol. 393, no. 10167, 2019, pp. 169–182.
- [20] H. Willén, R. Willén, and U. Stendahl, “Invasive Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix VI .: Prediction value of non-keratinizing , parakeratotic and orthokeratotic cell forms and clinical staging,” *Acta Radiol. Oncol.*, 2009.
- [21] K. Fujiwara, B. Monk, and M. Devouassoux-Shisheboran, “Adenocarcinoma of the Uterine Cervix: Why Is it Different?,” *Curr. Oncol. Rep.*, vol. 16, no. 12, 2014.
- [22] P. Nursing and A. H. Source, “Cervical cancer : The increasing incidence of adenocarcinoma and ...,” vol. 164, no. 8, pp. 1151–1152, 2001.
- [23] M. N. Zuher and E. J. William, “Cytology and Histopathology of the cervical herpes simplex infection”. *Cancer*, vol. 19, no. 7, pp. 1026–1031, 1965.
- [24] R. J. Goldberg and M. Gravell, “A Search for Herpes Simplex Virus Type 2 Markers in Cervical Carcinoma,” no. FEBRUARY, pp. 795–799, 1976.
- [25] H. Zur Hausen, “Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer,” *Cancer Res.*, vol. 36, no. February, pp. 794–794, 1976.
- [26] M. Durst, L. Gissmann, H. Ikenberg, and H. Zur Hausen, “A papillomavirus , DNA- from a cervical carcinoma and-its - prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions,” vol. 80, no. June, pp. 3812–3815, 1983.
- [27] L. Gissmann, L. Wolnik, H. Ikenberg, U. Koldovskyt, and H. G. Schnurcht, “Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers,” *Med. Sci.*, vol. 80, no. January, pp. 560–563, 1983.
- [28] L. Issmann, M. Boshart, M. Durst, H. Ikenberg, D. Wagner, and H. Zur Hausen, “Presence of Human Papillomavirus in Genital Tumors,” vol. 83, no. M, pp. 26–29, 1984.
- [29] M. Boshart, L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinzi, W. Scheurlen, and H. Hausen, “A new type od papillomavirus DNA, ites presence in genital cacer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer,” *EMBO J.*, vol. 3, no. 5, pp. 1151–1157, 1984.
- [30] M. Saraiya *et al.*, “US Assessment of HPV Types in Cancers : Implications for Current and 9-Valent HPV Vaccines,” *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 107, no. 6, 2015.
- [31] International Agency for Research on Cancer, *IARC Monographs on the Evaluation*

of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 90 Human Papillomaviruses.
International Agency for Research on Cancer, 2007.

- [32] C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, *Virus Taxonomy : Classification and Nomenclature of Viruses ; 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Inc., 2005.
- [33] K. Van Doorslaer, "Evolution of the Papillomaviridae," *Virology*, vol. 445, no. 1–2, pp. 11–20, 2013.
- [34] K. Van Doorslaer *et al.*, "ICTV ICTV Virus Taxonomy Profile : Papillomaviridae," pp. 989–990, 2018.
- [35] B. N. Fields, *Fields Virology*, Sixth. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer, 2013.
- [36] N. E. Escamilla, J. Ernesto, R. González, and G. Castro, "Utility of high - throughput DNA sequencing in the study of the human papillomaviruses," *Virus Genes*, no. 0123456789, 2017.
- [37] H. Sakai, "Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation," vol. 3, no. April, pp. 1–12, 2012.
- [38] S. Shafti-Keramat, A. Handisurya, E. Kriehuber, G. Meneguzzi, K. Slupetzky, and R. Kirnbauer, "Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses.," *J. Virol.*, vol. 77, no. 24, pp. 13125–35, 2003.
- [39] J. L. Dreyfuss, C. V. Regatieri, T. R. Jarrouge, R. P. Cavalheiro, L. O. Sampaio, and H. B. Nader, "Heparan sulfate proteoglycans: Structure, protein interactions and cell signaling," *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 81, no. 3, pp. 409–429, 2009.
- [40] C. A. Horvath, G. A. Boulet, V. M. Renoux, P. O. Delvenne, and J. P. J. Bogers, "Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: An overview," *Virol. J.*, vol. 7, pp. 1–7, 2010.
- [41] R. S. Aquino, E. S. Lee, and P. W. Park, *Diverse functions of glycosaminoglycans in infectious diseases*, vol. 93, no. C. Elsevier Inc., 2010.
- [42] P. M. Day, D. R. Lowy, and J. T. Schiller, "Heparan Sulfate-Independent Cell Binding and Infection with furin-precleaved papillomavirus capsids," *J. Virol.*, vol. 82, no. 24, pp. 12565–12568, 2008.
- [43] P. M. Day and M. Schelhaas, "Concepts of papillomavirus entry into host cells," *Curr. Opin. Virol.*, vol. 4, pp. 24–31, 2014.
- [44] J. T. Schiller, P. M. Day, and R. C. Kines, "Current understanding of the mechanism of HPV infection," *Gynecol. Oncol.*, vol. 118, no. 1 SUPPL. 1, pp. S12–S17, 2010.
- [45] J. Doorbar, "The papillomavirus life cycle," *J. Clin. Virol.*, vol. 32, no. SUPPL., p. 7, 2005.
- [46] V. A. N. G. Wilson, M. West, K. Woytek, and D. Rangasamy, "Papillomavirus E1 Proteins : Form , Function , and Features," 2002.

- [47] M. Bergvall, T. Melendy, and J. Archambault, "The E1 proteins," vol. 445, pp. 35–56, 2013.
- [48] N. Bastien and A. A. McBride, "Interaction of the Papillomavirus E2 Protein with Mitotic Chromosomes," vol. 134, pp. 124–134, 2000.
- [49] H. Romanczuk and P. M. Howley, "Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity," vol. 89, no. April, pp. 3159–3163, 1992.
- [50] S. Caldeira, W. Dong, and M. Tommasino, "Analysis of E7 / Rb Associations," vol. 119, pp. 363–379.
- [51] D. L. Jones and M. Karl, "Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators," vol. 7, pp. 327–337, 1996.
- [52] X. Yue, Y. Zhao, Y. Xu, and M. Zheng, "Mutant p53 in Cancer : Accumulation , Gain-of-Function , and Therapy," *J. Mol. Biol.*, vol. 429, no. 11, pp. 1595–1606, 2017.
- [53] F. Mantovani and L. Banks, "The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression," pp. 7874–7887, 2001.
- [54] D. Dimaio and D. Mattoon, "Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins," pp. 7866–7873, 2001.
- [55] M. Kim *et al.*, "Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 80, no. 12, pp. 1930–1935, 2010.
- [56] B. Zhang *et al.*, "The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- α ," vol. 310, pp. 100–108, 2003.
- [57] G. H. Ashrafi, M. R. Haghshenas, B. Marchetti, P. M. O'Brien, and M. S. Campo, "E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I," *Int. J. Cancer*, vol. 113, no. 2, pp. 276–283, 2005.
- [58] J. Doorbar, S. Ely, J. Sterling, C. McLean, and L. Crawford, "Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network," *Lett. to Nat.*, vol. 352, pp. 824–827, 1991.
- [59] J. Doorbar, "The E4 protein; structure, function and patterns of expression," *Virology*, vol. 445, no. 1–2, pp. 80–98, 2013.
- [60] J. Doorbar *et al.*, "The biology and life-cycle of human papillomaviruses.," *Vaccine*, vol. 30 Suppl 5, pp. F55-70, 2012.
- [61] P. M. Day, R. B. S. Roden, D. R. Lowy, and J. T. Schiller, "The Papillomavirus Minor Capsid Protein , L2 , Induces Localization of the Major Capsid Protein , L1 , and the Viral Transcription / Replication Protein , E2 , to PML Oncogenic Domains," *J. Virol.*, vol. 72, no. 1, pp. 142–150, 1998.
- [62] C. B. Buck, C. D. Thompson, Y. S. Pang, D. R. Lowy, and J. T. Schiller, "Maturation

of Papillomavirus Capsids,” vol. 79, no. 5, pp. 2839–2846, 2005.

- [63] E. Lazcano-ponce *et al.*, “Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women : Analysis of the control arm of the VIVIANE study,” vol. 2438, pp. 2428–2438, 2016.
- [64] Z. C. Wood, C. J. Bain, D. D. Smith, D. C. Whiteman, and A. Antonsson, “Oral human papillomavirus infection incidence and clearance : a systematic review of the literature,” pp. 519–526, 2017.
- [65] M. Akaaboune *et al.*, “Clearance and persistence of the human papillomavirus infection among Cameroonian women,” 2018.
- [66] J. W. K. Im *et al.*, “Factors Affecting the Clearance of High- risk Human Papillomavirus Infection and the Progression of Cervical Intraepithelial Neoplasia,” pp. 486–496, 2012.
- [67] L. Pirami, V. Giache, and A. Becciolini, “Analysis of HPV16, 18, 31 and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix,” *J. Clin. Pathol.*, pp. 600–604, 1997.
- [68] A. P. Cullen, R. Reid, M. Champion, and A. T. Lorinczl, “Analysis of the Physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm,” *J. Virol.*, vol. 65, no. 2, pp. 606–612, 1991.
- [69] G. Badaracco, A. Venuti, A. Sedati, and M. L. Marcante, “HPV16 and HPV18 in Genital Tumors : Significantly Different Levels of Viral Integration and Correlation to Tumor Invasiveness,” *J. Med. Virol.*, vol. 67, pp. 574–582, 2002.
- [70] R. W. Cone, A. C. Minson, M. R. Smith, and J. K. Mcdougall, “Conservation of HPV-16 E6/E7 ORF Sequences in a Cervical Carcinoma,” *J. Med. Virol.*, vol. 7, pp. 99–107, 1992.
- [71] K.-B. Choo, C.-C. Pan, and S. Han, “Integration of Human Papillomavirus type 16 into cellular DNA of Cervical Carcinoma: Preferential Deletion of the E2 Gene and Invariable Retention of the Long Control Region and the E6/E7 Open Reading Frames,” *Virology*, vol. 261, pp. 259–261, 1987.
- [72] M. Pett and N. Coleman, “Integration of high-risk human papillomavirus : a key event in cervical carcinogenesis ?,” *J. P.*, vol. 212, pp. 356–367, 2007.
- [73] D. Lee *et al.*, “Human Papillomavirus E2 Down-regulates the Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter *,” vol. 277, no. 31, pp. 27748–27756, 2002.
- [74] A. Roberto, A. Salvatore, L. Alessia, R. Roberto, and M. Francesco, “TEN YEARS OF HPV VACCINES: STATE OF ART AND CONTROVERSIES,” *Crit. Rev. Oncol. / Hematol.*, 2016.
- [75] L. Bruni *et al.*, “Articles Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level : a pooled analysis,” *Lancet Glob Heal.*, pp. 4–9, 2014.
- [76] K. V Shah, J. Salmero, and R. Pe, “HPV testing for cervical cancer screening appears more cost-effective than Papanicolau cytology in Mexico,” *Cancer Causes*

Control, vol. 22, pp. 261–272, 2011.

- [77] J. F. Krane, S. R. Granter, C. E. Trask, C. L. Hogan, and K. R. Lee, “Papanicolaou Smear Sensitivity for the Detection of Adenocarcinoma of the Cervix A Study of 49 Cases,” *Cancer Cytopathol.*, pp. 8–15, 2001.
- [78] S. Ruba, M. Schoolland, S. Allpress, and G. Sterrett, “Adenocarcinoma in Situ of the Uterine Cervix Screening and Diagnostic Errors in Papanicolaou Smears,” *Cancer Cytopathol.*, pp. 280–287, 2004.
- [79] C. W. Critchlow, P. Phdt, and K. K. Holmes, “Gynecology Determinants of cervical ectopia and of cervicitis : Age , oral contraception , specific cervical infection , smoking , and douching.”
- [80] Clinica de Colposcopia Fundación Cruz Talonia, “Colposcopia,” 2019. [Online]. Available: <https://clinicacruztonia.com/colposcopia>. [Accessed: 10-Sep-2017].
- [81] V. Lee, J. M. Tobin, and E. Foley, “Relationship of cervical ectopy to chlamydia infection in young women,” vol. 6, no. 2, pp. 104–106, 2006.
- [82] A. Moscicki, Y. Ma, and C. Holland, “Cervical Ectopy in Adolescent Girls with and without Human Immunodeficiency Virus Infection,” no. March, pp. 865–870, 1999.
- [83] P. Patil and P. Sharma, “Colposcopic evaluation of cervical erosion in symptomatic women,” *Int. J. Reprod. Contraception, Obstet. Gynecol.*, vol. 6, no. 6, p. 2207, 2017.
- [84] F. Girardi, O. Reich, K. Tamussino, and H. Pickel, *Burghardt’s Colposcopy and Cervical Pathology*. 2017.
- [85] P. G. Toon, J. R. Arrand, L. P. Wilson, and D. S. Sharp, “Human papillomavirus infection of the uterine cervix of women without cytological signs of neoplasia,” *Br. Med. J.*, vol. 293, pp. 1261–1264, 1986.
- [86] C. Duttagupta *et al.*, “Oncogenic human papillomavirus (HPV) infection and uterine cervical cancer : a screening strategy in the perspective of rural India,” *Eur. J. Cancer Prev.*, vol. 11, pp. 447–456, 2002.
- [87] L. Rocha-zavaleta, G. Yescas, R. M. Cruz, and F. Cruz-talonia, “Human papillomavirus infection and cervical ectopy,” *Int. J. Gynecol. Obstet.*, vol. 85, pp. 259–266, 2004.
- [88] O. L. Monroy, C. Aguilar, M. Lizano, F. Cruz-Talonia, R. M. Cruz, and L. Rocha-Zavaleta, “Prevalence of human papillomavirus genotypes, and mucosal IgA anti-viral responses in women with cervical ectopy,” *J. Clin. Virol.*, vol. 47, no. 1, pp. 43–48, 2010.
- [89] L. Hwang, J. Lieberman, Y. Ma, S. Farhat, and A.-B. Moscicki, “Cervical Ectopy and the Acquisition of Human Papillomavirus in Adolescents and Young Women,” *Obstet. Gynecol.*, vol. 119, no. 6, pp. 1164–1170, 2013.
- [90] N. G. Vázquez-Burgos, “Estudio de la expresion de p16 y ki-67 en tejido de ectopia cervical infectado por virus de papiloma humano,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.

- [91] G. M. Clifford *et al.*, "Comparison of Two Widely Used Human Papillomavirus Detection and Genotyping Methods , GP5 % / 6 % -Based PCR Followed by Reverse Line Blot Hybridization and Multiplex Type-Specific E7-Based PCR," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 54, no. 8, pp. 2031–2038, 2016.
- [92] G. Halec *et al.*, "Biological activity of probable/possible high-risk human papillomavirus types in cervical cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 94, no. 132, pp. 63–71, 2012.
- [93] K. Cooper, C. S. Herrington, E. S. Lo, M. F. Evans, and J. O. D. Mcgee, "Integration of human papillomavirus types 16 and 18 .. in-cervical adenocarcinoma," no. October 1991, pp. 382–384, 1992.
- [94] W. A. A. Tjalma and C. E. Depuydt, "Cervical atypical glandular cells and false negative HPV testing: a dramatic reality of the wrong test at the right place," *Eur. J. Gynaec, Oncol*, 2013.
- [95] K. S. Cuschieri *et al.*, "Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population," *J. Clin. Pathol.*, vol. 57, pp. 68–72, 2004.
- [96] N. Kantathavorn *et al.*, "Genotypic distribution of human papillomavirus (HPV) and cervical cytology findings in 5906 Thai women undergoing cervical cancer screening programs," *Infect. Agent. Cancer*, vol. 10, no. 7, pp. 1–9, 2015.
- [97] R. Senapati, B. Nayak, S. K. Kar, and B. Dwibedi, "HPV Genotypes distribution in Indian women with and without cervical carcinoma : Implication for HPV vaccination program in Odisha , Eastern India," *BMC Infect. Dis.*, vol. 17, no. 30, pp. 1–10, 2017.
- [98] G. D. García-Muentes, L. K. García-Rodríguez, R. I. Burgos-Galarraga, F. Almeida Carpio, and J. C. Ruiz-Cabezas, "Genotypes distribution of human papillomavirus in cervical samples of Ecuadorian women," *Rev. Bras. Epidemiol.*, vol. 19, no. 1, pp. 160–166, 1980.
- [99] L. Zhai and E. Tumban, "Gardasil-9 : A global survey of projected efficacy," *Antiviral Res.*, vol. 130, pp. 101–109, 2016.
- [100] L. Bruni, M. Diaz, X. Castellsague, E. Ferrer, F. X. Bosch, and S. De Sanjose, "Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents : Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings," *J. Infect. Dis.*, vol. 202, no. 12, pp. 1789–1799, 2010.
- [101] T. Tase, T. Okagaki, B. A. Clark, L. B. Twiggs, R. S. Ostrow, and A. J. Faras, "Human Papillomavirus DNA in Adenocarcinoma In Situ, Microinvasive Adenocarcinoma of the Uterine Cervix, and Coexisting Cervical Squamous Intraepithelial Neoplasia," *Int. J. Gynecol. Pathol.*, vol. 8, pp. 8–17, 1989.
- [102] M. T. El-mansi, K. S. Cuschieri, R. G. Morris, and A. R. W. Williams, "Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma and its precursors in Scottish patients," *Int. J. Gynecol. Cancer*, vol. 16, pp. 1025–1031, 2006.

- [103] E. C. Pirog *et al.*, "HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma , a worldwide analysis of 760 cases," *Mod. Pathol.*, vol. 27, pp. 1559–1567, 2014.
- [104] S. Vaccarella, S. Franceschi, P. J. F. Snijders, R. Herrero, and C. J. L. M. Meijer, "Concurrent Infection with Multiple Human Papillomavirus Types : Pooled Analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 19, no. 2, pp. 503–511, 2010.
- [105] E. L. Dickson, R. I. Vogel, P. R. L. Bliss, and L. S. Downs, "Multiple-Type Human Papillomavirus (HPV) Infections A Cross-Sectional Analysis of the Prevalence of Specific Types in 309 , 000 Women Referred for HPV Testing at the Time of Cervical Cytology," *Int. J. Gynecol. Cancer*, vol. 23, no. 7, pp. 1295–1302, 2013.
- [106] E. Roset Bahmanyar *et al.*, "Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in young adult women at enrolment in the multinational PATRICIA trial," *Gynecol. Oncol.*, vol. 127, no. 3, pp. 440–450, 2012.
- [107] G. J. J. Van Doornum *et al.*, "Regional distribution and incidence of human papillomavirus infections among heterosexual men and women with multiple sexual partners: A prospective study," *Sex. Transm. Infect.*, vol. 70, no. 4, pp. 240–246, 1994.
- [108] R. D. Burk, G. Y. F. Ho, L. Beardsley, M. Lempa, M. Peters, and R. Bierman, "Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women," *J. Infect. Dis.*, vol. 174, no. 4, pp. 679–689, 1996.
- [109] R. L. Winer, S. K. Lee, J. P. Hughes, D. E. Adam, N. B. Kiviat, and L. A. Koutsky, "Genital human papillomavirus infection: Incidence and risk factors in a cohort of female university students," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 157, no. 3, pp. 218–226, 2003.
- [110] K. Kavanagh *et al.*, "Estimation of HPV prevalence in young women in Scotland ; monitoring of future vaccine impact," *BMC Infect. Dis.*, vol. 13, no. 519, pp. 1471–2334, 2013.
- [111] A. N. N. Nielsen, C. Ms, S. Kru, G. E. R. Kjaer, C. Munk, and T. Iftner, "Type-Specific HPV Infection and Multiple HPV Types : Prevalence Danish Women," *Sex. Transm. Dis.*, vol. 35, no. 3, pp. 276–282, 2008.
- [112] M. Rousseau, M. Abrahamowicz, L. L. Villa, M. C. Costa, T. E. Rohan, and E. L. Franco, "Predictors of Cervical Coinfection with Multiple Human Papillomavirus Types," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 12, no. October, pp. 1029–1037, 2003.
- [113] S. N. Stacey, D. Jordan, P. J. F. Snijders, M. Mackett, J. A. N. M. M. Walboomers, and J. R. Arrand, "Translation of the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein from Bicistronic mRNA Is Independent of Splicing Events within the E6 Open Reading Frame," *J. Virol.*, vol. 69, no. 11, pp. 7023–7031, 1995.
- [114] S. F. Altekruse *et al.*, "Comparison of human papillomavirus genotypes , sexual , and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma : Northeastern United States," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 188, no. 3,

pp. 657–663, 2003.

- [115] W. C. Neoplasia, A. T. Lorincz, G. F. Temple, R. J. Kurman, A. B. Jenson, and W. D. Lancaster, “Oncogenic Association of Specific Human Papillomavirus Types With Cervical Neoplasia,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 79, no. 4, 1987.
- [116] M. Y. K. P. Lunkett *et al.*, “The value of HPV DNA typing in the distinction between adenocarcinoma of endocervical and endometrial origin,” *Pathology*, vol. 35, no. 5, pp. 397–401, 2003.
- [117] X. Carcopino *et al.*, “Evaluation of type-specific HPV persistence and high-risk HPV viral load quantitation in HPV positive women under 30 with normal cervical cytology,” *J. Med. Virol.*, vol. 83, no. 4, p. 637, 2011.
- [118] G. Negri *et al.*, “p16 ink4a and HPV L1 Immunohistochemistry is Helpful for Estimating the Behavior of Low-grade Dysplastic Lesions of the Cervix Uteri,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 32, no. 11, pp. 1715–1720, 2008.
- [119] H. Lee *et al.*, “Expression of HPV L1 Capsid Protein in Cervical Specimens With HPV Infection,” *Diagn. Cytopathol.*, vol. 36, no. 12, pp. 1–4, 2008.
- [120] N. Izadi-Mood, S. Sarmadi, Z. Eftekhari, H.-A. Jahanteegh, and S. Sanii, “Immunohistochemical expression of p16 and HPV L1 capsid proteins as predictive markers in cervical lesions,” *Arch. Gynecol. Obstet.*, vol. 289, pp. 1287–1292, 2014.
- [121] T. Yoshida *et al.*, “Immunochemical Analysis of HPV L1 Capsid Protein and p16 Protein in Liquid-based Cytology Samples From Uterine Cervical Lesions,” *Cancer Cytopathol.*, vol. 114, no. 2, pp. 83–88, 2008.
- [122] S. Sarmadi, N. Izadi-Mood, M. Pournashkari, F. Yarandi, and S. Sanii, “HPV L1 capsid protein expression in squamous intraepithelial lesions of cervix uteri and its relevance to disease outcome,” *Arch. Gynecol. Obstet.*, vol. 285, pp. 779–784, 2012.
- [123] L. M. Nelson, R. C. Rose, and J. Moroianu, “Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 26, pp. 23958–23964, 2002.
- [124] M. Soma and S. Kamaraj, “Detection of Human Papillomavirus in Cervical Grading by Immunohistochemistry and Typing of HPV 16 and 18 in High-Grades by Polymerase Chain Reaction,” *J. Lab. Physicians*, vol. 2, no. 1, p. 31, 2010.
- [125] C. M. Martin and J. J. O’Leary, “Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers,” *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 25, no. 5, pp. 605–615, 2011.
- [126] M. F. Parker, C. M. Zahn, K. M. Vogel, C. H. Olsen, K. Miyazawa, and D. M. O. Connor, “Discrepancy in the Interpretation of Cervical Histology by Gynecologic Pathologists,” vol. 100, no. 2, pp. 277–280, 2002.
- [127] W. G. McCluggage, H. Bharucha, L. M. Caughley, A. Date, P. W. Hamilton, and M. Y. Walsh, “Interobserver variation in the reporting of cervical colposcopic biopsy specimens : comparison of grading systems,” pp. 833–835, 1996.

- [128] P. D. Palma, P. G. Rossi, G. Collina, and A. M. Buccoliero, "The Reproducibility of CIN Diagnoses Among Different Pathologists Data From Histology Reviews From a Multicenter Randomized Study," pp. 125–132, 2009.
- [129] E. Stankiewicz *et al.*, "The prognostic value of Ki-67 expression in penile squamous cell carcinoma," *J. Clin. Pathol.*, vol. 65, no. 6, pp. 534–537, 2012.
- [130] C. Protzel, J. Knoedel, U. Zimmermann, C. Woenckhaus, M. Poetsch, and J. Giebel, "Expression of proliferation marker Ki67 correlates to occurrence of metastasis and prognosis, histological subtypes and HPV DNA detection in penile carcinomas," *Histol. Histopathol.*, vol. 22, no. 10–12, pp. 1197–1204, 2007.
- [131] F. S. Aslani, A. Safaei, M. Pourjabali, and M. Momtahan, "Evaluation of Ki67, p16 and CK17 markers in differentiating cervical intraepithelial Neoplasia and benign lesions," *Iran. J. Med. Sci.*, vol. 38, no. 1, pp. 15–21, 2013.
- [132] I. Z. Yildiz, A. Usubütün, P. Firat, A. Ayhan, and T. Küçükali, "Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature," *Pathol. Res. Pract.*, vol. 203, no. 6, pp. 445–449, 2007.
- [133] S. N. Agoff, P. Lin, J. Morihara, C. Mao, N. B. Kiviat, and L. A. Koutsky, "p16INK4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: A comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types," *Mod. Pathol.*, vol. 16, no. 7, pp. 665–673, 2003.
- [134] M. F. Mitchell, G. Tortolero-Luna, E. Cook, L. Whittaker, H. Rhodes-Morris, and E. Silva, "A Randomized Clinical Trial of Cryotherapy , Laser Vaporization , and Loop Electrosurgical Excision for Treatment of Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix," *Obstet. Gynecol.*, vol. 92, no. 5, pp. 737–744, 1998.
- [135] J. H. Bae, C. J. Kim, T. C. Park, S. E. Namkoong, and J. S. Park, "Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure," *Int. J. Cancer*, vol. 17, no. 9, pp. 1271–1277, 2007.
- [136] A. Aerssens *et al.*, "Natural history and clearance of HPV after treatment of precancerous cervical lesions," *Histopathology*, vol. 52, pp. 381–386, 2008.