



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y POTENCIAL ONCOGÉNICO
DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN EVERSIONES
GLANDULARES DEL CERVIX.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
OLGA LIDIA MONROY LAGOS

TUTOR:
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCÍA
Facultad de Medicina, UNAM.
Departamento de Microbiología y Parasitología

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, INCAN

Ciudad Universitaria, CDMX, a 12 de Junio de 2017.



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.

Dedicado a mi Hermosa Familia:

*Mi amado esposo Anuar
 Mi pequeño hijo Aarón Farid
 Mi aún no nata hija
 Y
 Mi mijaillovich, Metztli Trutru*

Ustedes son las luces que iluminan mi vida.

Agradecimientos

A la primera persona a la que quiero agradecer es a mi esposo: Anuar, por ser mi compañero durante todo el doctorado, por creer en mí, por apoyarme en cada momento y siempre animarme para terminar este ciclo en mi vida. Le quiero agradecer también por amarme con todos los defectos que poseo... Gracias.

A mi pequeño hijo Aarón Farid por darme un motivo más para concluir la tesis, por no ser tan malvado con su papá mientras yo terminaba de escribirla y por hacerme sentir una felicidad extrema cada vez que escucho su risa.

A mi hija por haber aguantado el embate y la presión de la escritura de esta tesis junto conmigo... pues no te quedaba de otra. Me hubiese gustado que tu estancia en mi vientre fuera tranquila pero la oportunidad llegó cuando ya estabas en camino.

A mi hija Metztli Trutru... lamento mucho que no estés aquí para ver que por fin lo hice, que por fin termine lo que comenzamos hace mucho tiempo juntas. Gracias por estar a mi lado, siempre a mi lado... my Whiteshadow.

A mi Madre, a aquella mujer que me enseñó que el trabajo, la dedicación y la perseverancia rinden frutos, a quien me apoyó y escuchaba mis choros justo antes de un examen.

A mi hermana Tere y mi sobrina Mayte por ser tan cariñosas conmigo y con toda mi familia.

A la Sra. Gloria Guerrero por haberme aceptado con mucho cariño como parte de su familia y por tenerme la confianza para platicar conmigo como lo haría con una amiga. Me hubiese gustado que la vida nos regalara más tiempo juntas... para escuchar sus sabios consejos.

A mi amigo que se hizo hermano y después compadre: Oscar, por las largas, divertidas e interesantes pláticas y por todos tus consejos.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta quien me aceptó como parte de su equipo de trabajo y fungió como mi tutora principal, estando siempre pendiente de mi trabajo, dedicándome el tiempo necesario para resolver mis dudas y buscando la forma de que pudiera avanzar... Gracias por su apoyo incondicional y por confiar en mí.

A la Dra. Beatriz Gomez García por haber formado parte de mi comité tutor y tomarse el tiempo para guiarme, corregirme y aportar parte de su conocimiento a mi proyecto.

A la Dra. Marcela Lizano Soberón por haber sido parte de mi comité tutor, hacer observaciones y aportaciones muy valiosas para mi desarrollo académico. También por haberme abierto las puertas de su laboratorio permitiéndome trabajar en más de una temporada.

Al Dr. Fernando Cruz-Talonia y a la Dra. Rosa María Cruz Mimiaga quienes fueron parte fundamental de este proyecto, pues me permitieron entrar a la clínica, brindarme las muestras y además compartir su conocimiento e inquietudes.

A la Dra. Sara Huerta Yépez por aceptarme en su laboratorio como visita y hacerme sentir como parte de su equipo de trabajo y por dedicarme el tiempo para hacer que avanzara en mi proyecto.

Gracias a mi recorrido por distintos laboratorios tuve la fortuna de conocer a muchas personas que dejaron una huella en mí, pido una disculpa de antemano por aquellas personas a las que por mi mala memoria no nombro en este agradecimiento.

A mis compañeras del laboratorio de Biomédicas: Cris y Vale, por haberme ayudado con las técnicas que no conocía, las observaciones para antes del tutorial y compartir reactivos y células. Pero, más que eso, por compartir tantas horas de charla, baile y canto... sus penas y alegrías, por convertirse en mis Amigas.

A Irma porque desde mi llegada al laboratorio me trato con mucho cariño, me hizo sentir a gusto y me ayudó a adaptarme y hacer migas con el resto del equipo. Gracias Amiga.

A Doña Evelin por recibirme cada día con una sonrisa, compartir buenos momentos y además ayudarme con unas PCR's. A Idalia a quien por mala suerte no tuve tiempo de llegar a conocer en ese instante pero a quien el tiempo me permitió conocer mejor después. Y a Lizbeth con quien tuve la oportunidad de trabajar en equipo.

A los miembros de mi segundo laboratorio... INCan: Adela, Adriana, Elenae, Mariana, Verónica, Asunción, Hilda, Saida, Alfredo, Joaquín, Fernando, Mauricio, Héctor y Erick por haberme aceptado como un miembro más, ofrecerme su ayuda en las cuestiones experimentales, compartir conmigo su conocimiento dentro y fuera de los seminarios y por los buenos momentos de diversión y alegría que compartimos. Quiero agradecer de forma particular a la técnico Adela Carrillo por su apoyo y experiencia para la realización de las PCR's y secuenciación.

A los miembros del último laboratorio que visité en el Hospital Infantil de México: Gullermina, Belén, Gabriela, Erandi, Norma, Jesús, Daniel, Marco, Sra. Margarita (Secretaria) y la otra Sra. Margarita (quien me presentó los chocolates más ricos que he probado en México) por su trato amable, su paciencia algunos para darme las clases de inmunohistoquímica y otras para darme clases de tejido, por no ser tan rudos conmigo en los seminarios y por permitirme hacer algo más que acompañarlos a comer en el hospital.

A la Dra. Grethel Yescas y al Dr. Omar Cruz por permitirme estar en la cirugías y darme algunas clases de colposcopia, pero agradezco más que me hicieran su amiga y que el Dr. Omar me adoptara como su hermanita y estar al pendiente de mi salud.

A todos los doctores con quien tuve el gusto de compartir el curso que impartió el Dr. Cruz-Talonia. A Gerardo quien funge como secretario en la clínica y muy amablemente me permitio el acceso a los expedientes de la pacientes. Al todo el personal administrativo y a las enfermeras

A todas las mujeres que me permitieron estar en un momento muy difícil y vulnerable de su vida y por aceptar formar parte de este proyecto. Gracias.

A la M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías por apoyo técnico brindado al presente trabajo.

A CONACYT por el financiamiento brindado para el número de proyecto 49167-M. Y también por haberme brindado durante todo el doctorado la beca alimentaria con lo cual logré dedicarme de tiempo completo al posgrado.

Al posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas por aceptarme y ofrecerme una oportunidad para seguir creciendo académicamente y por patrocinar mi asistencia a los congresos. Quiero agradecer también al personal administrativo particularmente a Blanca Huerta, Azucena Ayala, Zenaida Martínez y Marisol Villafañez por hacer que los trámites administrativos fueran menos tediosos y regalarme siempre una sonrisa.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por abrir las puertas y permitirme utilizar todos los espacios: sus laboratorios, salones, biblioteca... en fin todo lo que un estudiante necesita para crecer.

A la Universidad Nacional Autónoma de México... mi Alma Máter. Por haberme permitido conocerla desde pequeña e ir la amando durante mi desarrollo académico.

México, Pumas, Universidad

¡GOYA! ¡GOYA!

¡CACHUN, CACHUN, RA, RA!

¡CACHUN, CACHUN, RA, RA!

¡GOYA!

¡¡UNIVERSIDAD!!

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
2.1. El cervix.....	3
2.1.1. Anatomía del cervix.....	3
2.1.2. Histología del cervix.....	4
2.2. Eversión glandular.....	11
2.2.1. Definición.....	11
2.2.2. Frecuencia.....	12
2.2.3. Síntomas y tratamiento.....	13
2.2.4. Asociación de la eversión glandular con infecciones.....	19
2.3. Virus del Papiloma Humano (VPH).....	27
2.3.1 Características generales y clasificación.....	27
2.3.2 Estructura del virus.....	30
2.3.3 Estructura del genoma.....	31
2.3.4 Ciclo replicativo.....	32
2.3.5 Virus del papiloma humano y cáncer.....	38
3. Antecedentes.....	42
3.1. Eversión glandular y el virus del papiloma humano.....	42
4. Justificación.....	45
5. Hipótesis.....	47
6. Objetivos.....	48
6.1. Objetivo general.....	48
6.1. Objetivos particulares.....	48
7.- Metodología.....	49
7.1. Población de estudio.....	49
7.2. Extracción de ADN.....	51
7.3. PCR para el gene β -globina.....	52
7.4. PCR con MY09/MY11.....	52
7.5. PCR con L1C1/L1C2.....	53
7.6. PCR con PR3/PR4.....	54
7.7. PCR con VPH-18F/VPH-18R.....	54
7.8. Secuenciación.....	55
7.9. PCR múltiple anidada.....	56
7.10. PCR de LCR de VPH-18.....	58
7.11. PCR de E6 de VPH-18.....	59
7.12. PCR de E7 de VPH-18.....	60
7.13. Microarreglo de tejidos.....	60
7.14. Inmunohistoquímica.....	62

7.15. Análisis estadístico.....	65
8. Resultados.....	66
8.1. Población de estudio.....	66
8.2. Determinación de la calidad del ADN extraído.....	66
8.3. Determinación de la positividad a VPH.....	69
8.3.1. PCR con los oligonucleótidos universales MY09/MY11.....	69
8.3.2. PCR con los oligonucleótido universales L1C1/L1C2.....	69
8.4 Determinación del tipo viral.....	71
8.4.1. PCR con PR3/PR4.....	71
8.4.2. PCR con VPH-18F/HPV-18R.....	71
8.4.3. Secuenciación.....	74
8.5. Determinación de co-infecciones: PCR múltiple anidada.....	77
8.6. Corroboración del tipo viral VPH-18 en eversiones glandulares.....	81
8.7. Microarreglo de tejidos.....	83
8.7.1. Localización y determinación de la presencia de VPH en muestras de eversión glandular.....	83
8.7.2. Búsqueda de cambios que puedan indicar una posible transformación maligna.....	86
9. Discusión.....	93
10. Conclusiones.....	102
11. Bibliografía.....	104
12. Anexos.....	114

1. Resumen

La eversión glandular es la condición en la cual las células cilíndricas del endocérnix se extienden más allá del orificio cervical externo, es decir hacia el exocérnix. En una imagen colposcópica la eversión glandular se puede observar como una zona periorificial de color más rojo, la superficie se describe como "aterciopelada" y las vellosidades características del epitelio cilíndrico suelen dar la impresión de un racimo de uvas. Se considera un hallazgo normal o no patológico del cérnix que es atribuido a cambios hormonales o reactivos. Aunque la mayoría de las mujeres no presentan síntomas, algunas llegan a presentar: descarga vaginal, dolor pélvico, dolor durante las relaciones sexuales, sangrado intermenstrual, sangrado postcoital, disuria y nocturia.

La eversión glandular ha sido considerada como un factor de riesgo para la adquisición de varias enfermedades de transmisión sexual. La infección con el Virus del Papiloma Humano (VPH) es una enfermedad de transmisión sexual importante y existen algunos reportes que indican una posible relación entre la presencia de la eversión glandular y la presencia de VPH. La Dra. Leticia Rocha realizó un estudio enfocado en determinar la presencia de VPH, particularmente el VPH-16. En este primer estudio se mostró que la detección de ADN de VPH fue más común en la eversión glandular que en los controles normales o sanos.

La población de estudio se conformó por 349 mujeres: 112 de eversión glandular, 106 de infección con VPH y 131 de endocérnix "Sano". La presencia del virus se determinó por medio de PCR empleando los oligonucleótidos universales MY09/MY11 y L1C1/L1C2. La identificación de los tipos virales se realizó por medio de PCR específica para VPH-16 y VPH-18, y después por secuenciación directa. La presencia de infecciones múltiples fue determinada por medio de PCR múltiple anidada. Finalmente, para la evaluación de posibles cambios que indiquen una transformación maligna se realizaron en un microarreglo de tejidos inmunohistoquímicas contra L1 de VPH, Ki-67 y p-Survivina (Thr34).

Empleando los oligonucleótidos MY09/MY11 y L1C17L1C2 se determinó la presencia de VPH en el 90.1% de las muestras de eversión glandular, la presencia es similar en las muestras de infección con VPH (91.84%), mientras que la presencia en las muestras de endocérnix "Sano" fue de 35.88%. Por medio de las PCRs específicas, la secuenciación y la PCR múltiple anidada se identificó el tipo viral en 79 (86.81%) de las muestras de eversión glandular: 62 (68.13%) muestras con infección sencilla o única, 14 (15.38%) muestras con infección doble y 3 (3.33%) muestras con infección triple. Se determinó la presencia de al menos un virus de alto riesgo en 73 (80.22%) en las muestras de eversión glandular, siendo el VPH-18 el más frecuente, pues se identificó en 68 (74.72%) de las muestras (52 infecciones sencillas, 13 infecciones dobles y 3 infecciones triples), el VPH-16 se determinó en 8 (8.79%) de las muestras (4 infecciones sencillas y 4 co-infecciones con VPH-18). 5 muestras fueron determinadas con un virus de bajo riesgo en una infección sencilla con VPH-43. Finalmente, se determinó la presencia de VPH-97 en 1 (1.1%) en una infección sencilla.

En el microarreglo de tejidos se observó que la expresión de L1 de VPH es nuclear y estadísticamente mayor en las muestras de eversión glandular VPH positivas comparada con las muestras VPH negativas; la densidad x área es mayor en aquellas determinadas como infectadas por otros tipos virales, seguida por las determinadas como VPH-16, las co-infecciones con VPH-18 y por último VPH-18 sólo. Al analizar la expresión de Ki-67 encontramos que esta es mayor en las muestras de eversión glandular determinadas como VPH positivas comparada con las muestras VPH negativas; la mayor expresión se observa en las muestras infectadas por otros tipos virales, seguida por los tipos VPH-16 y VPH-18 y finalmente las co-infecciones. Por último al analizar la expresión de survivina fosforilada (Thr34) encontramos que no hay diferencias significativas entre las muestras determinadas como VPH positivas y VPH negativas.

La conclusión es que el la eversión glandular es susceptible de ser infectada por el VPH, dado que se determinó su presencia en 90.1% de las muestras, siendo el VPH-18 el más frecuentemente encontrado (74.72%). Se determinó la localización nuclear de L1 de VPH y se observó en las muestras VPH positivas una mayor expresión de L1 y Ki-67 comprada con las muestras VPH negativas.

2. Introducción

2.1. El cérvix

2.1.1 Anatomía del cérvix

El cérvix junto con la vagina y la vulva conforman la porción baja del aparato genital femenino. El cérvix constituye la parte más distal del útero, por lo cual también recibe el nombre de cuello del útero o cuello uterino (Figura 1).³⁰

El cérvix tiene a menudo una forma cilíndrica en las mujeres nulíparas y menos frecuentemente una forma cónica, mide de 3 a 4 cm de longitud y de 2.5 a 3 cm de diámetro; con el parto sufre modificaciones anatómicas puesto que se dilata hasta alcanzar 9-10 cm, después del parto se reestructura sin embargo, mantiene dimensiones mayores a las iniciales.^{18,30}

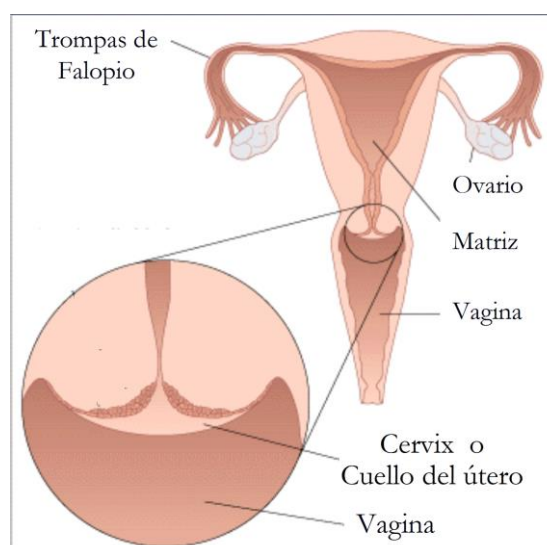


Figura 1. Ubicación del cérvix en el aparato reproductor femenino.

Es dividido para su estudio en dos porciones. La parte superior que se extiende desde el *istmo* el cual corresponde al *orificio cervical interno* (OCI) y llega hasta el borde superior del *fórnix vaginal* llamado también *orificio cervical externo* (OCE). A esta parte superior se le denomina *cérvix supravaginal* o *endocérvix*. La otra, la parte inferior se extiende hacia la vagina y es la que puede observarse con el colposcopio, a esta región se le denomina *portio vaginalis*, *hocico de tenca*, *porción vaginal* o *exocérvix*.^{4,18,30}

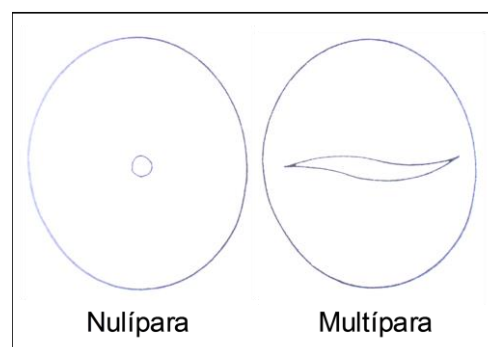


Figura 2. Aspecto del orificio cervical externo del cérvix. Redondeado en la mujer nulípara y con forma de S itálica en la mujer múltipara. Tomada de De Palo, 1996

El canal endocervical tiene un aspecto fusiforme, comunica la cavidad uterina con la cavidad vaginal y en consecuencia con el exterior, constituye de este modo una verdadera “puerta del útero” que comúnmente se encuentra cerrada y protegida por un denso tapón mucoso que se hace fluido durante el período ovulatorio. Este canal endocervical tiene una longitud aproximada de 2.5 a 3 cm y su diámetro varía siendo de 6 a 8 mm en su punto más ancho. El orificio cervical externo como previamente se mencionó es la parte terminal del canal endocervical, es puntiforme y redondeado en la mujer nulípara, pero se modifica ensanchándose en sentido horizontal después del parto de tal manera que en las multíparas adquiere la forma denominada “S itálica” (Figura 2). El orificio cervical externo experimenta modificaciones en relación al ciclo menstrual: se agranda en la fase menstrual y aún más en la fase ovulatoria.^{4,30}

2.1.2. Histología del cérvix

El cérvix está constituido por dos tipos de epitelio, el exocérvix es revestido por un epitelio plano estratificado no queratinizado, este epitelio también es llamado escamoso o pavimentoso; mientras que el endocérvix se encuentra revestido por un epitelio cilíndrico o columnar (Figura 3).^{4,18,27,30,44}

El exocérvix está revestido por el epitelio escamoso que es semejante al de la vagina y tiene capas comparables a las de la piel. Este epitelio segrega y acumula cantidades variables de glucógeno; tiene una superficie cornificada sin embargo, esta no se completa habitualmente y la queratinización sólo se produce como resultado de una irritación prolongada.^{4,18,30}

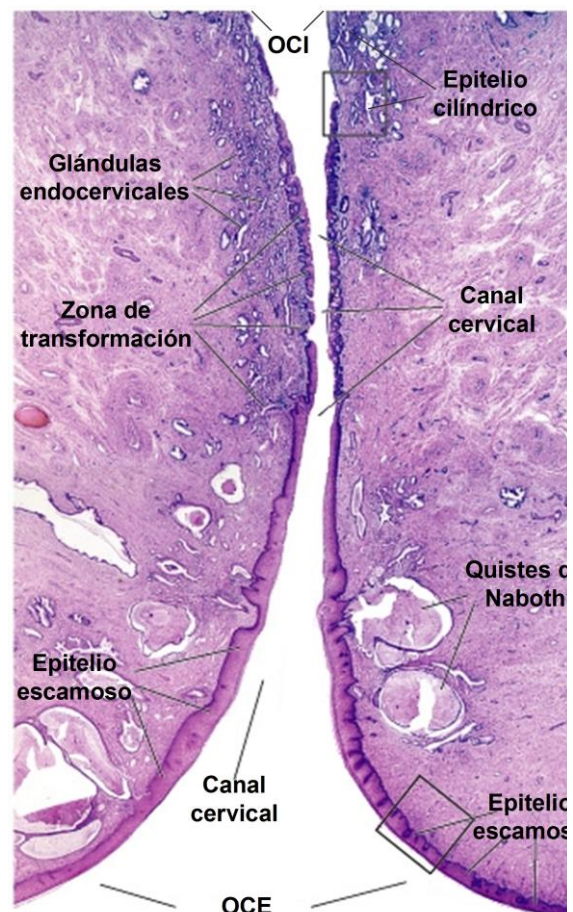


Figura 3. Microfotografía de un cérvix humano teñido con hematoxilina-eosina de una mujer posmenopáusia. Modificada de Ross, 2004.

El epitelio escamoso tiene un patrón de maduración característico, a medida que aumenta la maduración las células crecen, aumentan su volumen y disminuye la cantidad de material nuclear. Este epitelio se compone, como su nombre lo indica de varios estratos, el pasaje de un estrato a otro es progresivo. Generalmente se divide en cuatro estratos (Figura 4).^{4,18,27,30,44}

El estrato más profundo es el basal o germinativo. Está formado por una hilera única de células cúbicas dispuestas en sentido perpendicular con respecto a la membrana basal que lo separa del estroma. Estas células son pequeñas y tienen un núcleo hipercromático, redondo u ovalado, que ocupa la mayor parte de la célula. En estas células se pueden observar figuras mitóticas.

El siguiente es el estrato parabasal o espinoso profundo está formado por varias hileras de células ligeramente poliédricas, con núcleos redondos u ovalados más o menos voluminosos. En estas células es posible observar nucleolos.^{4,18,30}

Inmediatamente después se encuentra el estrato intermedio o espinoso superficial que está compuesto por varias hileras de células fusiformes con núcleo pequeño, claro y vesicular; su citoplasma también es claro ocupado a menudo por vacuolas y con abundante glucógeno.^{4,18,30}

El estrato superficial o corneo está compuesto por grandes células planas, alargadas con un núcleo pequeño y picnótico. El citoplasma de estas células contiene una cantidad variable de queratina y colágeno.^{4,18,30}

La altura del epitelio es determinada por la producción de hormonas y depende de la edad y la estimulación hormonal. En la etapa reproductiva el epitelio es alto y bien diferenciado; durante la niñez y la posmenopausia el epitelio es bajo, contiene algunas capas de pequeñas células poco diferenciadas y la estratificación es apenas visible.^{4,18,30}

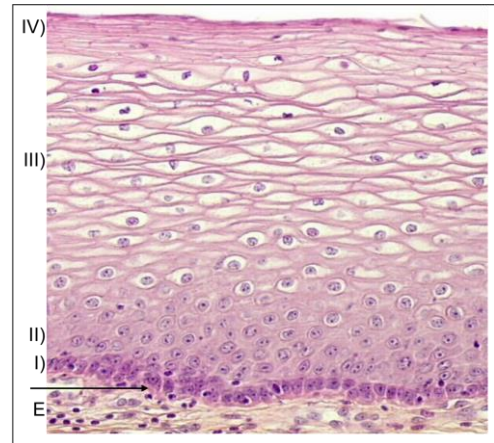


Figura 4. Epitelio escamoso del exocervix sano. Se divide en cuatro estratos: I) basal, II) parabasal, III) intermedio, y IV) superficial o corneo. La flecha indica a la membrana basal y por debajo se encuentra el estroma (E). Tomada de Ross, 2004.

El endocérnix está revestido por un epitelio completamente distinto. El epitelio cilíndrico monoestratificado, está constituido por una única hilera de células cilíndricas altas dispuestas en empalizada cuyo núcleo se localiza en la porción basal de las células (Figura 5).^{1,4,18,27,30}

Las células cilíndricas miden de 20 a 35 micras de alto y de 5 a 9 micras de ancho, algunas de ellas tienen cilios. Su núcleo ovalado y pequeño se localiza normalmente en el tercio inferior de la célula; excepto durante el embarazo y el periodo ovulatorio cuando se encuentra en la porción media. El citoplasma de estas células es abundante, contiene vacuolas y gotitas de mucina.^{4,18,30}

El epitelio cilíndrico no forma una superficie aplanada en el canal cervical, sino que forma múltiples pliegues longitudinales que sobresalen en la luz del canal, dando lugar a proyecciones papilares. También forma invaginaciones en el estroma cervical hasta una profundidad de 5 a 8 mm, dando lugar a la formación de criptas endocervicales llamadas *glándulas endocervicales*.⁴

Esta arquitectura compleja, con pliegues y criptas da al epitelio cilíndrico una apariencia granular en una inspección visual.^{1,4,101,106,109}

La longitud de la mucosa endocervical es constante durante toda la vida, pero experimenta diferentes modificaciones según las características del tejido conectivo subyacente. Sí este tejido se esclerosa, como cuando ocurre la menopausia, el epitelio se retrae hacia el interior.³⁰

Las células del epitelio cilíndrico secretan moco, que permite lubricar el cérnix y la vagina. El moco es un hidrogel compuesto por agua, mucina, electrolitos, azúcares, proteínas solubles, lípidos e inmunoglobulinas. La cantidad y las propiedades del moco secretado por las células cilíndricas varía en las

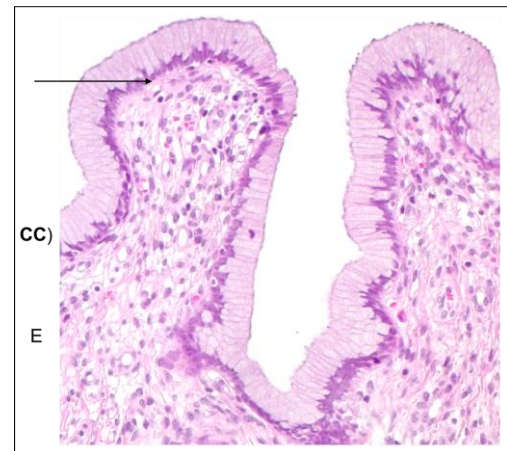


Figura 5. Epitelio cilíndrico del endocérnix sano. Está constituido por una sola capa de células cilíndricas (CC) con núcleo basal. La flecha indica la localización de la membrana basal que separa al epitelio cilíndrico del estroma (E).

diferentes fases del ciclo menstrual por acción de las hormonas. Se han identificado 2 tipos de moco cervical, el tipo E de estrogénico y el tipo G de gestativo. En la mitad del ciclo la cantidad del moco producido aumenta 10 veces. Este moco es menos viscoso y provee un medio favorable para la migración de los espermatozoides en la cavidad uterina; mientras que en otros momentos del ciclo el moco es más viscoso y forma un tapón ácido que evita la entrada de los espermatozoides y patógenos.^{101,104,106,109}

El bloqueo de los orificios de salida de las glándulas cervicales causa la retención de secreciones mucosas y la formación de dilataciones quísticas en la mucosa cervical llamadas *quistes de Naboth*. Los quistes de Naboth aparecen con frecuencia, pero son clínicamente importantes sólo si se encuentran en gran cantidad y producen un agrandamiento pronunciado del cérvix.^{44,101}

Por debajo del epitelio cilíndrico puede llegar a observarse una capa de células cúbicas, las células de reserva. Estas células de reserva son las células del cérvix más pequeñas miden 12-14 micras de ancho y 8-10 micras de alto, tienen un voluminoso núcleo ovalado y claro, la cromatina es muy fina y a veces se aprecia el nucléolo; el citoplasma es escaso, anófilo y a menudo con vacuolas. Esta célula de reserva no se observa frecuentemente en tejidos normales, es más común observarla en casos de hiperplasia y metaplasia como un segundo estrato de células pequeñas entre el epitelio cilíndrico y la membrana basal. Las células de reserva se caracterizan por su bipotencialidad, puesto que son capaces de diferenciarse tanto en células cilíndricas como en células escamosas mediante el proceso de metaplasia o, sin presentar diferenciación multiplicarse dando lugar a cuadros de hiperplasia.^{1,4,27,30}

La membrana basal se extiende de manera continua justo por debajo de los dos epitelios del cérvix: el epitelio estratificado y el epitelio cilíndrico. Y esta membrana basal se continúa hasta el epitelio cilíndrico del endometrio. La membrana basal mide 3 μm de grosor y está compuesta de colágena de tipo IV y V, fibronectina, proteoglicanos, lámina densa y lámina lúcida. La lámina densa limita con el estroma cervical subyacente, y la lámina lúcida limita con las células del epitelio.^{4,30}

El estroma cervical se encuentra localizado por debajo de la membrana basal y es el tejido mejor representado en el cérvix. Está compuesto de tejido conectivo fibroso, el cual se encuentra constituido por vasos capilares, células conectivas, fibras elásticas, fibras musculares lisas en continuación con las fibras musculares del cuerpo uterino y de la vagina.^{4,30} Se logra distinguir un tejido conectivo profundo o compacto, rico en fibras con aspecto homogéneo, desprovisto de glándulas, vascularizado y con vasos de gran calibre de paredes gruesas; y un tejido conectivo superficial o laxo, que es menos homogéneo, que contiene glándulas y numerosos vasos pequeños de paredes delgadas.³⁰

La unión escamocolumnar o escamocilíndrica (UEC), es el límite entre el epitelio escamoso y el epitelio cilíndrico. La descripción clásica establece que esta unión es brusca, encontrándose los dos epitelios en un punto definido que en condiciones normales coincide con el orificio cervical externo, aunque esta unión es precisa sólo en 33% de los especímenes que se analizan.³ La posición de la UEC se encuentra en cualquier punto del cérvix y varía, esta variación depende de factores como la edad, momento del ciclo menstrual, la acción de las hormonas ováricas, los traumatismos del parto y algunas condiciones fisiológicas como el embarazo (Figura 6).^{4,30,44}

Durante la niñez y la perimenarquia, la UEC se encuentra en el orificio cervical externo o muy cerca de él. Esta UEC se conoce como unión escamocolumnar original, pues representa el empalme de los epitelios durante la embriogénesis y la vida intrauterina. Tras la pubertad y el periodo reproductivo, los órganos genitales femeninos crecen por influencia estrogénica. El cérvix se hincha, se agranda y esto conlleva a la eversión del epitelio cilíndrico de la parte inferior del conducto cervical hacia el exocérvix, lo que se conoce como eversión glandular. Así, la UEC original se reubica en el exocérvix, lejos del orificio externo. Comienza un proceso metaplásico y se forma una UEC nueva entre el epitelio metaplásico recientemente formado y el epitelio cilíndrico. A partir del período perimenopáusico, el cérvix va reduciéndose por la falta de estrógenos, acelerando el desplazamiento de la nueva UEC hacia el orificio externo. En la posmenopausia la nueva UEC normalmente suele no ser observada, pues se encuentra en el canal endocervical (Figura 6).^{106,109}

El área entre el epitelio escamoso nativo y el epitelio cilíndrico, o sea entre la unión escamocolumnar original y la nueva unión escamocolumnar se denomina zona de transformación (Figura 7). El cambio de estos epitelios es gradual y se presenta en aproximadamente el 60% las mujeres en edad reproductiva.^{4,27,30}

La metaplasia se define como la transformación de un tipo de célula madura a un segundo tipo maduro. La transformación suele incluir la conversión de un tipo de célula cilíndrica secretora en otro tipo, una célula escamosa, estratificada. Este proceso ocurre en diferentes sitios del cuerpo como en los bronquios, estómago, vejiga, glándulas salivales y cérvix.⁴ Aún no se conocen bien los factores que inducen la metaplasia escamosa, pero es posible que incluyan condiciones ambientales, irritación mecánica, inflamación crónica, cambios en el pH o modificaciones hormonales.^{4,27,30}

El reemplazamiento del epitelio cilíndrico por escamoso puede darse mediante dos procesos distintos: por metaplasia fisiológica ascendente o metaplasia fisiológica descendente. Estos dos procesos pueden darse de manera simultánea o en momentos distintos.^{4,27,30}

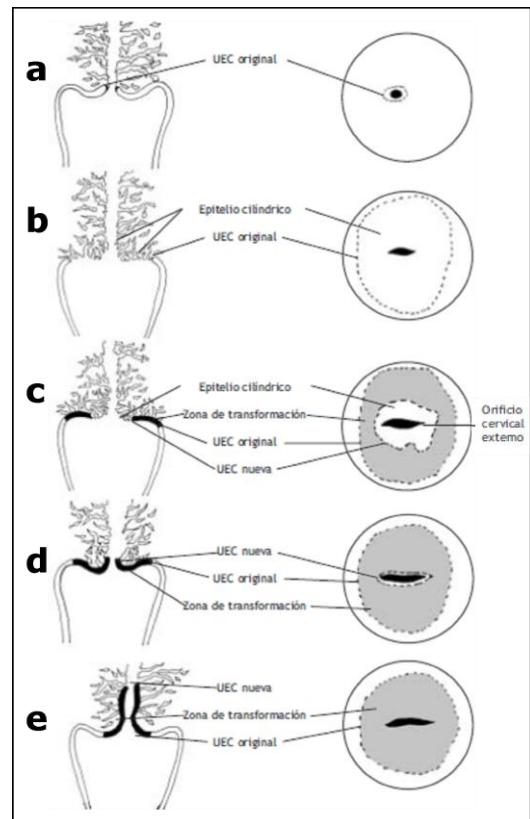


Figura 6. Representación esquemática de las modificaciones en la ubicación de la zona de unión escamocolumnar (UEC) del cérvix con la edad: a) Edad prepúber: antes de la menarquia; b) Edad fértil: después de la pubertad y durante el embarazo; c) Edad fértil: hacia los 30 años; d) Edad fértil: hacia la menopausia; e) después de la menopausia. Tomada de Sellors, 2003.

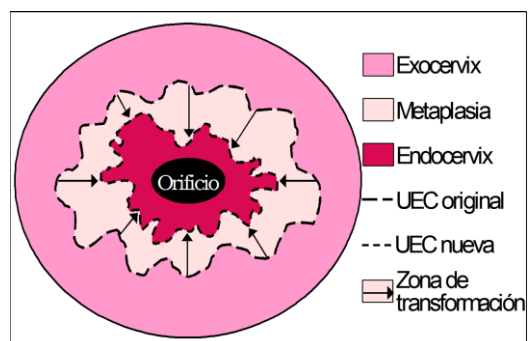


Figura 7. Formación de la metaplasia escamosa. La unión escamocolumnar original migra hacia el exocervix, el epitelio cilíndrico expuesto al exocervix sufre el proceso de metaplasia. La transformación en una superficie escamosa lleva a la UEC hacia el orificio cervical externo y por último al canal endocervical.

La metaplasia fisiológica ascendente se da por el crecimiento del epitelio escamoso adyacente el cual se monta sobre el epitelio cilíndrico.^{27,30}

En la metaplasia fisiológica descendente o metaplasia escamosa se da por la hiperplasia de las células de reserva que es aparición, proliferación y estratificación de las células de reserva subcilíndricas y finalmente la transformación en epitelio escamoso (Figura 8).^{4,27,30}

El primer signo de metaplasia escamosa es la aparición de una sola capa de células de reserva subcilíndricas, células pequeñas, redondas y de núcleos oscuros. A medida que las células de reserva proliferan, las células inmaduras resultantes adquieren más citoplasma y los núcleos disminuyen su tamaño. El epitelio metaplásico delgado y neoformado se denomina inmaduro cuando presenta poca o ninguna estratificación y no producen glucógeno. Con el tiempo las células cilíndricas de la superficie degeneran y esfacelan. A medida que continúa el proceso, las células estratificadas desarrollan características de escamosas y adquieren glucógeno, para efectos prácticos, el epitelio escamoso metaplásico maduro no se puede diferenciar del epitelio escamoso original (Figura 8).^{4,27,109}

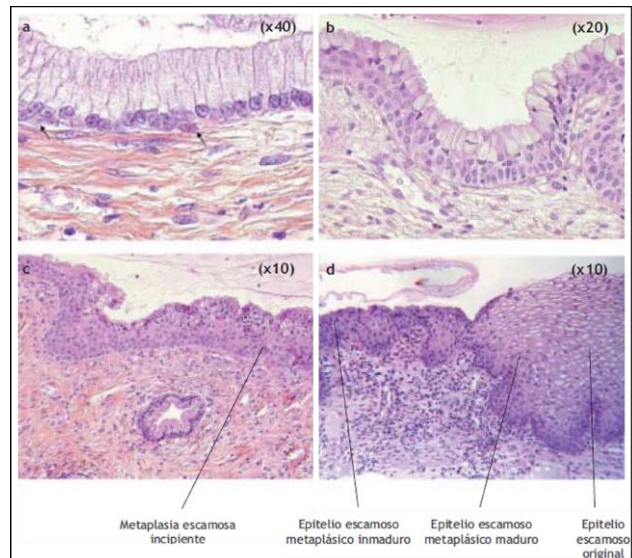


Figura 8. Desarrollo de la metaplasia escamosa: a) las flechas indican la aparición de las células de reserva; b) las células de reserva proliferan hasta formar dos capas hiperplásicas; c) las células de reserva proliferan más (epitelio metaplásico inmaduro) y se diferencian; d) epitelio metaplásico maduro. Tomada de Sellors, 2003.

A medida que continúa el proceso, las células estratificadas desarrollan características de escamosas y adquieren glucógeno, para efectos prácticos, el epitelio escamoso metaplásico maduro no se puede diferenciar del epitelio escamoso original (Figura 8).^{4,27,109}

El proceso metaplásico suele comenzar en la UCE original y desplazarse centripetamente hacia el orificio externo. Cuando la mujer se acerca a la menopausia la UEC nueva avanza hacia el orificio externo, durante la perimenopausia el cérvix se reduce por falta de estrógenos lo que acelera el desplazamiento de la UEC y en la posmenopausia la UCE ya se ha desplazado y se le puede encontrar en el canal endocervical.^{4,109}

2.2. Eversión glandular

2.2.1 Definición

La eversión glandular es considerada un hallazgo normal o no patológico del cérvix. Es la condición en la cual las células cilíndricas del endocérvix se extienden más allá del orificio cervical externo, es decir en el exocérvix (Figura 9).

La eversión glandular es término que se ha empleado para englobar a la ectopia cervical y al ectropión, ya que suelen usarse como sinónimos.^{30,44} Debido a que el epitelio cilíndrico es más delgado que el escamoso puede observarse la vascularización que se encuentra por debajo del estroma, dando la apariencia de pérdida o erosión del epitelio por lo que la eversión glandular también recibió erróneamente el nombre de erosión.^{44,47,94}

La ectopia como mencionamos previamente consiste en la presencia en el exocérvix de sólo epitelio cilíndrico de superficie, que se dispone por lo común formando pequeñas papilas arquitectónicamente muy semejantes a las vellosidades intestinales. La ectopia cervical es congénita, por una sustitución incompleta del epitelio mülleriano, que en un principio revestía el exocérvix y la vagina, por el epitelio urogenital.^{30,44}

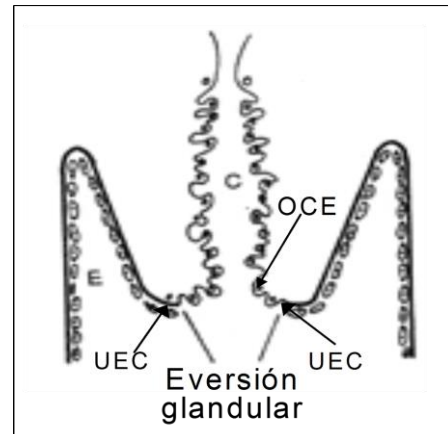


Figura 9. Eversión glandular es la presencia del epitelio cilíndrico (C) más allá del orificio cervical externo (OCE), en el exocérvix, la unión escamocolumnar se desplaza y se localiza en el exocérvix. Tomada de Chuaqui, 1991.

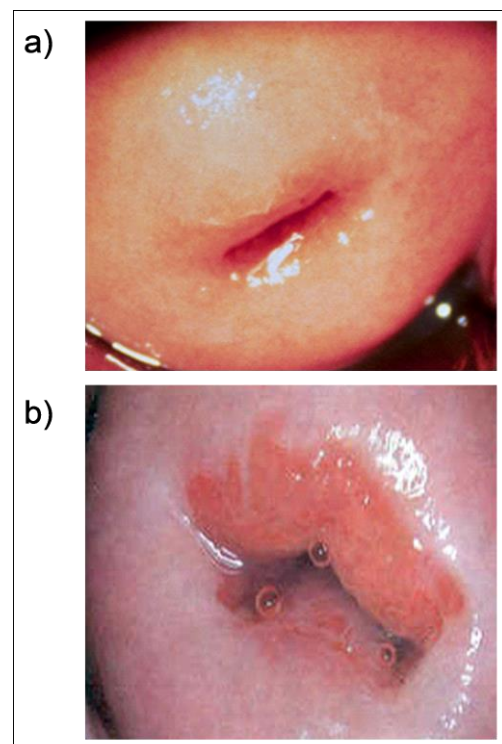


Figura 10. Imágen colposcópica del cérvix después de la aplicación de ácido acético al 3%. a) un cérvix normal (sano) el cual tiene un color rosa pálido homogéneo y b) un cérvix con eversión glandular, la cual se observa como una región rojiza periorificial de la apariencia aterciopelada .

El ectropión se define por la presencia en el exocérnix del epitelio de superficie, las glándulas y el estroma. Se deriva de la exposición hacia el exterior de un epitelio cilíndrico cuya localización originaria era endocervical, su presencia se ha asociado con la exposición a elevados niveles de estrógenos, como en el caso de la pubertad, el embarazo y el uso de anticonceptivos hormonales, así como secundario a eventos traumáticos, como la laceración o dilatación del cérnix^{12,30,44,47}

En una imagen colposcópica la eversión glandular se puede observar como una zona más o menos periorificial, de color más rojo con respecto al área periférica recubierta con epitelio escamoso. La superficie suele ser uniforme y se describe como "aterciopelada" por su aspecto finamente y regularmente granular, y las vellosidades características del epitelio cilíndrico suelen dar la impresión de un racimo de uvas (Figura 10).^{30,44}

2.2.2 Frecuencia

La prevalencia reportada para la ectopia se encuentra dentro del intervalo de 17% al 50%.⁶⁸ De Palo evaluó la frecuencia de la eversión glandular en mujeres nulíparas jóvenes en la región de Millan, estimaron que el 47% de estas mujeres tenían una ectopia cervical, sin embargo, menciona que a este porcentaje deben agregarse otros casos comprendidos en un 37 % de patologías más graves. Concluye que se puede presumir que en la población primigrávida 2 de cada 3 mujeres son portadoras de eversión glandular y que no se debe perder de vista que con el avance de la edad se asiste una "regresión" de la ectopia y el ectropión que modifica su frecuencia.^{30,44}

Lee et al.⁶³ realizaron un estudio en el cual documentaron la presencia o ausencia de eversión glandular. El estudio se realizó en la Clínica de Medicina Genitourinaria de Portsmouth, Inglaterra, se incluyeron mujeres de 16 a 24 años. Sus resultados nos muestran evidencia de eversión glandular en el 46.3 % de las mujeres. Al-Riyami et al.² determinaron una prevalencia de eversión glandular de 27% en mujeres casadas de 15 a 49 años.

También, se han realizado estudios en mujeres que presentan sangrado postcoital o intermenstrual, se encontró eversión glandular en 33.6% de las mujeres con sangrado postcoital, en 42% de las mujeres con sangrado intermenstrual atendidas en clínicas ginecológicas y en 30% de las mujeres con sangrado intermenstrual atendidas en clínicas de colposcopia.^{53,103}

Se debe considerar que la eversión glandular sigue un curso de evolución, después de que se da la eversión glandular ocurre un proceso de metaplasia el cual puede tomar meses o años, sin embargo, tiene un tiempo limitado. Así, la prevalencia de eversión glandular en una población puede detectar sólo a las mujeres que tienen esta eversión glandular en el momento del estudio. En una población varias mujeres pueden portar esta condición y otras pueden desarrollarla de tal manera que la mayoría de las mujeres, sino es que todas, tendrán una eversión glandular en algún momento de su vida.^{30,68}

2.2.3 Sintomatología y tratamiento

Previamente mencionamos que la eversión glandular normalmente sigue un proceso de eliminación por medio de metaplasia en el cual el epitelio cilíndrico evertido es reemplazado por epitelio escamoso. La velocidad de sustitución del epitelio cilíndrico no es constante por lo cual este proceso puede tomar de meses a años. Sin embargo, el consumo de anticonceptivos hormonales orales ha sido asociado a una persistencia de la eversión glandular.^{30,58,63,68,79} Bright et al.¹² reportan que el uso de anticonceptivos hormonales combinados (COC) está asociado con una eversión glandular grande ($>0.48 \text{ cm}^2$).

Algunas mujeres llegan a presentar síntomas, el síntoma más común es la descarga vaginal, y otros menos frecuentes son el dolor pélvico, el dolor durante las relaciones sexuales, el sangrado intermenstrual, el sangrado postcoital, el prurito vulvar, la disuria y la nocturia.^{47,68,103}

De Palo³⁰ recomienda se de tratamiento a la eversión glandular, argumentando que un epitelio estratificado plano es más fisiológico en el exocérvix, sin embargo, su opinión no tiene referencias bibliográficas para

soportar dicha sugerencia. Donahue³³, Medej⁷³ y Moreira⁷⁸ indican que la eversión glandular sufre un proceso fisiológico y que sólo debe ser tratado cuando hay síntomas.

De Luca Brunori et al.²⁹ realizaron un estudio en mujeres asintomáticas con eversión glandular para evaluar la inmunidad celular. Tomaron biopsias tanto de la eversión glandular como del epitelio estratificado, y analizaron por inmunohistoquímica la presencia de linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 y células de Langerhans. Sus resultados muestran una reducción de estas poblaciones en las zonas con eversión glandular, mientras que se mantienen normales en las zonas del exocérnix. Basándose en estos hallazgos concluyen que la eversión glandular representa una lesión no estable por lo cual proponen que el tratamiento sea realizado de rutina.

Actualmente el tratamiento para la eversión glandular no está indicado, ya que como hemos mencionado es un fenómeno fisiológico en el cual de manera habitual el epitelio escamoso sustituye al epitelio cilíndrico. El tratamiento es recomendado únicamente para eliminar la sintomatología y consiste en eliminar la eversión glandular, es decir, eliminar la presencia del epitelio cilíndrico del exocérnix. Los tratamientos empleados son: la escisión electroquirúrgica, la cauterización láser, la crioterapia, el ultrasonido y los tratamientos químicos.^{4,20,30,63,68}

La diatermocoagulación (DTC) o escisión electroquirúrgica con asa (LEEP) es un medio físico de destrucción de los tejidos. Se basa en el principio enunciado por Joule en 1843, según el cual la corriente eléctrica al atravesar un objeto electroconductor, experimenta una pérdida de tensión y desarrolla calor. Dado que los tejidos del cuerpo son conductores discretos, si se les hace atravesar una corriente eléctrica se desarrolla en ellos calor. El calor generado en el tejido, provoca un "daño" que es proporcional a la temperatura alcanzada. El daño se divide en tres fases: el daño térmico, la necrosis térmica y la vaporización.³⁰

El daño térmico se da entre los 45 °C y los 55 °C: afecta en diversa medida a las células, algunas son más sensibles que otras. De las células lesionadas se

liberan moléculas que estimulan una reacción inflamatoria que lo elimina, mientras que los elementos conectivos y del infiltrado reactivo se desarrolla el tejido cicatrizal.³⁰

La necrosis térmica se produce entre los 55 °C y los 99 °C: todas las células mueren inmediatamente, pero sus componentes (comprendida el agua) permanecen en el sitio; las moléculas orgánicas que la constituyen resultan más o menos destruidas, según su estabilidad y la temperatura alcanzada.³⁰

La vaporización se presenta cuando la temperatura supera los 100 °C: se caracteriza por la transformación en vapor de agua de toda el agua contenida en el tejido. Los sólidos residuales pueden desnaturalizarse dejando una finísima capa pardusca o bien carbonizarse o aún también volatilizarse. La vaporización es típica del láser, sin embargo, es excepcional con la LEEP.³⁰

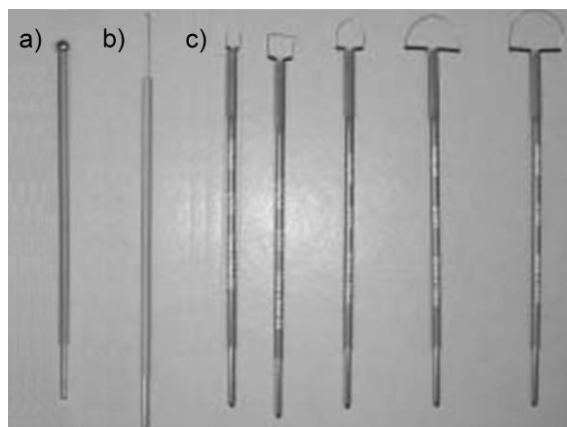


Figura 11. Electrodo empleado en la LEEP: a) electrodo de bola; b) electrodo de microaguja; y c) asas. Tomada de Sellors, 2003.

En la LEEP como se mencionó previamente se emplea la corriente eléctrica para cortar el tejido. La energía eléctrica se transforma en calor y en energía lumínica, el calor generado por el arco eléctrico de alto voltaje y el tejido permite al médico cortar.^{30,109}

Los electrodos cortantes son asas de acero inoxidable o alambre de tungsteno muy fino que permiten cortar en diferentes anchos y profundidades. Sin embargo, para la coagulación se emplean temperaturas más elevadas y se producen efectos térmicos mayores a las de corte, para la coagulación se emplean generalmente

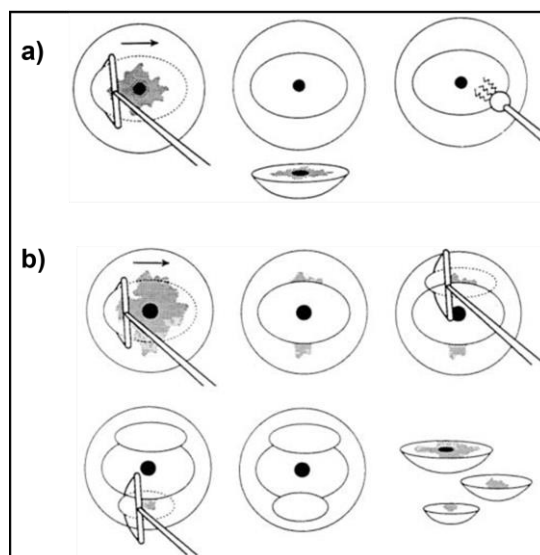


Figura 12. Esquema de una escisión de una lesión cervical empleando LEEP: a) con un solo pase; b) con varios pases de la asa. Tomada de Sellors, 2003.

electrodos de bola o aguja (Figura 11). La principal ventaja de la LEEP es que se extirpa el tejido afectado, en lugar de destruirlo, lo cual permite que se pueda emplear el tejido obtenido para un examen histológico (Figura 12).^{30,109}

El láser representa una “actualización” del mismo principio terapéutico en el cual se basa la DTC o LEEP: elevación de la temperatura. En este caso la elevación de la temperatura es obtenida con una gran cantidad de energía luminosa, hasta alcanzar niveles para lograr la completa vaporización del tejido que se va a eliminar en un tiempo breve, evitando de este modo el incremento térmico en áreas adyacentes y reduciendo al mínimo las fases de necrosis térmica y daño térmico. Se realiza con un láser unido al colposcopio de manera que se logra una extraordinaria focalización en un punto, permite regular con máxima precisión el área destruida, tanto en extensión como en profundidad.^{30,109}

Por otro lado, la crioterapia requiere el suministro constante de gases comprimidos refrigerantes. En la crioterapia se emplea una criosonda con un extremo de metal conductor (generalmente plata o cobre), la superficie entra en contacto directo con el tejido (Figuras 13 y 14). Se logra una disminución de la temperatura mediante la expansión del gas comprimido a través de un pequeño orificio en la criosonda. Si se logra un excelente contacto entre la punta de la criosonda y el

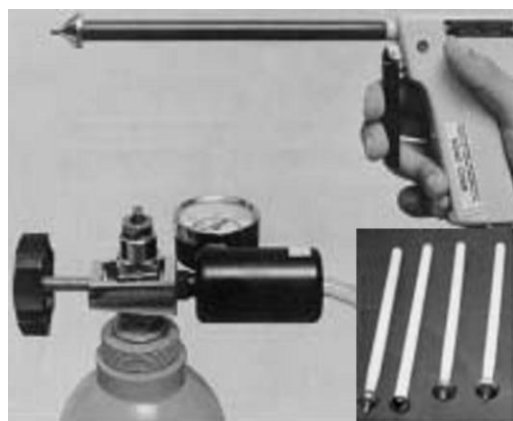


Figura 13. Equipo de crioterapia: sondas, aplicador, entrada de gas, tornillo de sujeción, manómetro, silenciador y tubo por el que pasa el gas. Tomada de Sellors, 2003.

tejido, la crioterapia con óxido nitroso (N_2O) alcanza los $-89\text{ }^{\circ}C$; aunque se emplea menos frecuentemente el dióxido de carbono (CO_2) el cual alcanza los $-68\text{ }^{\circ}C$ en el núcleo de la bola de hielo y alrededor de los $-20\text{ }^{\circ}C$ en la periferia. Se ha observado que si un tejido se congela a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}C$ o inferior por al menos 1 minuto, se produce crionecrosis, entonces, con este tratamiento sólo se obtienen tejidos necrosados por congelación.³⁰⁻¹⁰⁹

La crioterapia debe constar de 2 ciclos de congelación–descongelación, cada uno de ellos con 3 minutos de congelación seguidos de 5 minutos de descongelación. La congelación adecuada se alcanza cuando la periferia de la bola de hielo sobrepasa los 4-5 mm. del borde exterior de la punta de la sonda, con esto se asegura la crionecrosis hasta una profundidad de 5 mm. La crioterapia es una técnica sencilla, barata e indolora, que no suele requerir un anestésico local, ni una fuente de electricidad y un extractor de humos. Sin embargo, la crioterapia tiene la importante desventaja de no “ver” el efecto inmediato

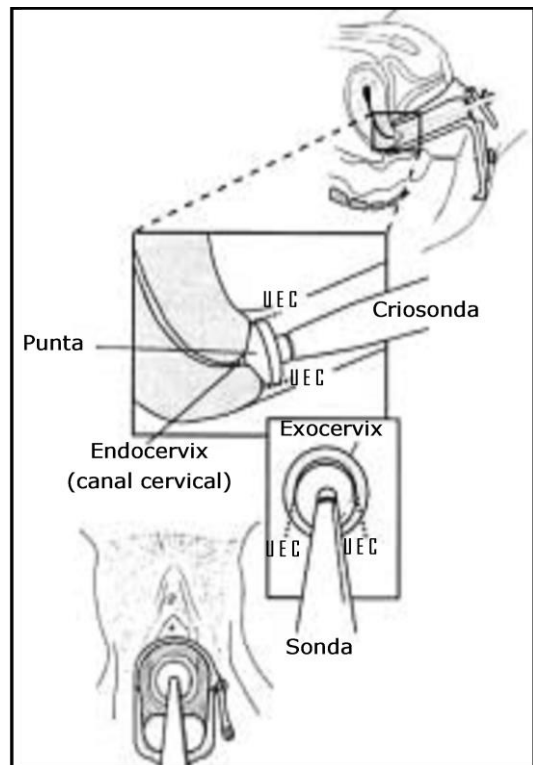


Figura 14. Colocación de la punta de la criosonda en el cérvix. Tomada de Sellors, 2003.

de la operación y por lo tanto, de llegar a mayor o menor profundidad de lo necesario; otra desventaja es que la crioterapia es ablativa, lo cual implica que después de la crioterapia no hay un tejido o muestra histopatológica por evaluar; y que la intercesión resulta ser bastante prolongada.^{30,109}

La terapia con ultrasonido (US) es una nueva tecnología de ablación que difiere de los métodos tradicionales. El ultrasonido brinda energía térmica con la destrucción por calor del tejido a profundidad sin dañar la superficie del tejido en el camino del equipo de ultrasonido. El efecto terapéutico es realizado por los efectos térmicos, mecánicos y de cavitación del ultrasonido en el tejido, considerando las siguientes características: i) la profundidad del área que será tratada; ii) el tejido debe ser tratado concienzudamente para realizar la inactivación de microorganismos patogénicos y productos metabólicos, y de esta manera erradicar la irritación local; iii) mejoramiento de la microcirculación local; y iv) no hay pérdida de tejido, entonces, el cérvix es preservado físicamente completo con buena elasticidad y la función fisiológica no es influenciada. La eficacia del tratamiento es comparable a la terapia con láser, sin embargo, el costo del tratamiento es 30% mayor que la terapia con láser.²⁰

El tratamiento farmacológico se basa en dos posiciones: la primera es que la eversión glandular haya sido provocada por una flora vaginal patológica que produce una hiperplasia de la mucosa endocervical; la segunda es que la eversión glandular debe ser considerada una condición no patológica a menos que se superponga una inflamación. Según ambas teorías una cura médica que elimine un estado inflamatorio debería resolver la situación. La inflamación puede ser eliminada con bactericidas o bacteriostáticos (que van desde lavados antisépticos hasta antibióticos) o con supresores de la inflamación (como los corticoides). Sin embargo, la eversión glandular no desaparece sino que se hace menos evidente, a pesar de ello puede lograrse la reducción de los síntomas.³⁰

Otro tipo de tratamiento es el contacto del epitelio cilíndrico monoestratificado con productos químicos cáusticos como: ácidos o nitrato de plata. Si la destrucción del tejido es completa (dejando el tejido conectivo al desnudo) y alcanza en la periferia los límites con el epitelio pluriestratificado, que es más resistente, este último se expandirá para tapizar el área que quedó libre del epitelio cilíndrico; en cambio, si es incompleta, sólo se produce un sufrimiento celular y es probable que se produzca una reacción de adaptación local y la creación de una zona de transformación anormal. La aplicación del agente debe ser hecha preferentemente bajo el colposcopio, esta aplicación bajo observación permite una acción cauterizante y la destrucción del epitelio. En cambio, cuando se aplica en tapete en toda la mucosa la cauterización debe ser más suave (para no provocar reacciones en toda la vagina), normalmente provoca la aparición de una zona de transformación anormal.³⁰

El ácido deoxiribonucleico (DRNA) es un tratamiento tópico, el plan terapéutico consiste en supositorios vaginales de DRNA, administrados por 15 días mensualmente y la dosis se reduce gradualmente. El seguimiento de los pacientes permite determinar que el tratamiento es efectivo (97.4%).²³ Otro tratamiento tópico es el polideoxiribonucleico (PDRN), el cual consiste en supositorios vaginales por 24 días. Este tratamiento es eficaz ya que disminuye los síntomas, reduce la inflamación y reestablece el balance en las poblaciones de linfocitos B y T.²⁴ Los resultados muestran que estas drogas pueden ser una alternativa para el tratamiento de la eversión glandular.^{8,28,32}

2.2.4 Asociación de la eversión glandular con infecciones

La eversión glandular ha sido considerada como un factor de riesgo para la adquisición de varias enfermedades de transmisión sexual. Se ha buscado una asociación entre la eversión glandular con: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Citomegalovirus y Virus del Papiloma Humano (VPH).⁶⁸

Chlamydia trachomatis

La infección genital con *Chlamydia trachomatis* es la infección bacteriana de transmisión sexual más común.^{42,87} De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) anualmente se detectan 92 millones de infecciones, este número de infecciones ha ido en aumento en las últimas 3 décadas.^{32,42} La prevalencia de la *Chlamydia trachomatis* es muy variada, depende de la edad y la región geográfica, así, como del diseño del estudio y las técnicas de detección.⁴² En general, los estudios realizados muestran una mayor prevalencia en adolescentes (9-25%) comparada con la población adulta (4-12%) y que es mayor en grandes ciudades sobre todo en aquellas con una alta densidad poblacional. ^{42,87} En México se ha documentado que la prevalencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* en el tracto genital inferior varía entre 3.3 y 28.4%.²⁵

La *Chlamydia trachomatis* puede ser transmitida durante el sexo vaginal, oral o anal, y durante el parto.⁸⁷

La infección por *Chlamydia* es asintomática en el 70 % de las mujeres, sin embargo, pueden experimentar flujo genital anormal o dolor leve al orinar durante la primera a tercera semana de exposición, algunas mujeres raramente presentan sangrado vaginal, sangrado poscoital y dolor abdominal. Esta infección provoca cervicitis, endometritis, salpingitis y las secuelas incluyen enfermedad pélvica inflamatoria, embarazo ectópico e infertilidad por obstrucción tubárica.^{42,87}

De los 35 estudios analizados para determinar la posible asociación entre la infección con *Chlamydia trachomatis* y eversión glandular: 29 reportan una asociación; de estos estudios 20 encuentran dicha asociación empleando un análisis univariado,^{5,19,37,41,54,55,60,64,67,69,89,96,97,99,105,108,110,114,120,122,} en 1 estudio⁴⁸ la asociación es determinada empleando un análisis bivariado y en otros 8 estudios la asociación se mantiene cuando emplean un análisis multivariado.^{9,26,52,63,86,113} Y únicamente en 6 estudios no se encontró asociación entre la infección con *Chlamydia trachomatis* y eversión glandular, 3 estudios^{40,79,98} muestran que no hay asociación empleando un análisis univariado, en 3 estudios^{51,58,76} la asociación desaparece cuando emplean un análisis multivariado o un estudio de cohorte.⁹⁸ En este último estudio realizado por Rahm et al.⁹⁸ se encontró una alta frecuencia de infección entre las mujeres con eversión glandular, pero la muestra fue pequeña por lo cual no mostró diferencia estadística. El estudio realizado por Geisler et al.⁴⁵ se observa un resultado similar, a pesar de no encontrar una asociación estadísticamente significativa observan que la eversión glandular es uno de los hallazgos más comunes en las mujeres infectadas con *Chlamydia trachomatis* (Tabla 1).

Basándonos en el análisis de los estudios anteriores podemos decir que la existe una asociación entre la presencia de la eversión glandular y la infección con *Chlamydia trachomatis*.

La explicación más agradable de la asociación entre la presencia de la eversión glandular y la tasa de infección con *Chlamydia trachomatis* es simplemente que la gran área de epitelio cilíndrico expuesto en el exocérnix aumenta la oportunidad de que una infección pueda ser adquirida después del coito con un hombre infectado, el gran número de células cilíndricas susceptibles y disponibles para la progresión del ciclo del agente infeccioso. Posiblemente el área de células cilíndricas ectópicas puede variar entre mujeres jóvenes y maduras y de esa manera influenciar sus diferentes grados de infección.^{55,63,89} Entonces puede ser asumida una posible relación causa-efecto, de tal manera que la eversión glandular favorece la infección, dada la afinidad de la *Chlamydia trachomatis* por el epitelio glandular.^{63,68}

Tabla 1. Lista de estudios analizados para determinar la asociación entre *Chlamydia trachomatis* y eversión glandular.

Autor	Año	Lugar	Tipo de estudio	Tipo de análisis	Asociación
Ripa et al.	1978	Suecia	Transversal	Univariado	Si
Hobson et al.	1980	Inglaterra	Transversal	Univariado	Si
Tait et al.	1980	Inglaterra	Transversal	Univariado	Si
Arya et al.	1981	Inglaterra	Transversal	Univariado	Si
Mallison et al.	1982	Inglaterra	Transversal	Univariado	Si
Chacko and Lovchik.	1984	EUA	Transversal	Univariado	Si
Word et al.	1984	Inglaterra	Transversal	Univariado	Si
Harrison et al.	1985	EUA	Transversal	Multivariado	Si
Handsfield et al.	1986	EUA	Transversal	Multivariado	No
Kovacs et al.	1987	Australia	Transversal	Univariado	Si
Blythe et al.	1988	EUA	Transversal	Multivariado	Si
Fish et al.	1989	Inglaterra	Transversal	Univariado	Si
Louv et al.	1989	EUA	Transversal	Univariado	Si
Pavoneen et al.	1989	Suecia	Prueba Clínica	Multivariado	Si
Rahm et al.	1990	Suecia	Transversal	Univariado	Si
Rahm et al.	1991	Suecia	Cohorte	Univariado	No
Shafer et al.	1993	Francia	Transversal	Univariado	Si
Peulescu et al.	1993	Rumania	Transversal	Univariado	Si
Stergachis et al.	1993	EUA	Transversal	Multivariado	Si
Bontis et al.	1994	Grecia	Transversal	Univariado	Si
Critchlow et al.	1995	EUA	Transversal	Multivariado	Si
Quinn et al.	1996	EUA	Transversal	Univariado	Si
Brunham et al.	1996	Kenia	Cohorte	Multivariado	Si
Herrmann B et al.	1996	Nicaragua	Transversal	Univariado	Si
Sánchez et al.	1998	Perú	Transversal	Univariado	Si
Dowe G et al.	1999	Jamaica	Transversal	Multivariado	Si
Jacobson et al.	2000	EUA	Transversal	Multivariado	No
Sedlecki et al.	2001	Serbia	Transversal	Univariado	Si
Moscicki et al.	2001	EUA	Transversal	Multivariado	No
Guerra-Infante et al.	2003	México	Transversal	Bivariado	Si
Zbrock et al.	2004	Polonia	Transversal	Univariado	Si
Morrison et al.	2004	EUA	Transversal	Univariado	No
Lesczyńska-Garzelak et al.	2005	Polonia	Transversal	Univariado	Si
Filipp et al.	2005	Polonia	Transversal	Univariado	No
Lee et al.	2006	Inglaterra	Transversal	Multivariado	Si
Geisler et al.	2007	EUA	Transversal	Multivariado	No

Neisseria gonorrhoeae

La infección por *Neisseria gonorrhoeae* es la segunda infección de transmisión sexual más frecuente.⁵⁶ Este agente infeccioso ocasiona cerca de 60 millones de nuevos casos por año. En México se ha documentado que la prevalencia de la infección por gonorrea en el tracto genital inferior varía entre 2.8 y 11.6 %, dependiendo de la población muestreada para el estudio y la metodología utilizada para el diagnóstico.²⁵

La infección es causada por un diplococo Gram negativo intracelular. La infección se transmite principalmente por contacto sexual con un caso activo o por la vía perinatal. *Neisseria gonorrhoeae* se adhiere a la superficie de los epitelios endocervical, vaginal, rectal, faríngeo, conjuntivo e incluso a los espermatozoides y las células ciliadas de las trompas de falopio.^{24,38,124}

En mujeres los síntomas suelen aparecer entre los 7 y 30 días después de la infección y consisten en disuria, descarga vaginal y ocasionalmente fiebre. Del 30 al 50% de las infecciones son asintomáticas.³⁸ La infección genital puede causar endocervicitis, enfermedad pélvica inflamatoria (EIP) o ascender, lo cual conduce a la afección de las trompas de Falopio o salpingitis, siendo ésta una de las causas más comunes de infertilidad femenina en el mundo.^{25,124}

Podemos observar varias similitudes entre *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*, tales como su hábitat intracelular y su preferencia por el epitelio cilíndrico, así como aspectos clínicos similares. Las infecciones por *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* pueden producir complicaciones ginecológicas como: la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) que se asocia a infertilidad tubaria, embarazo ectópico y dolor pélvico crónico.^{5,56} Es posible que esta sea una de las razones por la cual algunos investigadores pensaran que puede existir una asociación entre la eversión glandular y la infección con *Neisseria gonorrhoeae*, como ocurre con la infección con *Chlamydia trachomatis*.

Se analizaron 11 estudios con el objetivo de determinar la posible asociación entre la eversión glandular y la infección con *Neisseria gonorrhoeae*. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se pudo confirmar dicha asociación. (Tabla 2)^{5,9,19,26,47,67,76,79,93,110,113}

Goldacre et al.⁴⁷ reportan que no hay una diferencia apreciable en la prevalencia de levaduras y hongos, *Tricomonas vaginalis* y *Neisseria gonorrhoeae* entre mujeres con y sin erosión. Ayra et al.⁵ encontraron un resultado similar, no fue encontrada una asociación con ectopia en aquellas mujeres infectadas con *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida* o *Tricomonas vaginalis*.

En 6 de los estudios investigados^{9,19,26,67,110,113} se determinó que la ectopia está asociada a la infección con *Chlamydia trachomatis* pero no con *Neisseria gonorrhoeae*. Plummer et al.⁹³ mencionan varios factores estuvieron relacionados con la presencia de infecciones con *Neisseria gonorrhoeae*: ser joven, el tiempo de prostitución, el uso de anticonceptivos orales y la presencia de ectopia incrementan el riesgo de una infección. Aunque, no encontraron una asociación independiente entre ectopia y *Neisseria gonorrhoeae* después de realizar un análisis multivariado, reiteran que la ectopia incrementa el riesgo de una o más infecciones con *Neisseria gonorrhoeae* por exponer un área extensa de epitelio columnar al organismo.

Dado que, ninguno de los 11 estudios que investigaron la posible asociación entre eversión glandular y la infección con *Neisseria gonorrhoeae* fue capaz de confirmar dicha asociación, entonces, podemos concluir que estas dos condiciones no están asociadas.

Tabla 2. Lista de estudios analizados para determinar la asociación entre *Neisseria gonorrhoeae* y eversión glandular

Autor	Año	Lugar	Tipo de estudio	Tipo de análisis	Asociación
Goldacre et al.	1978	Escocia	Transversal	Univariado	No
Arya et al.	1981	Inglaterra	Transversal	Univariado	No
Chacko and Lovchik.	1984	EUA	Transversal	Univariado	No
Blythe et al.	1988	EUA	Transversal	Multivariado	No
Louv et al.	1989	EUA	Transversal	Univariado	No
Stergachis et al.	1993	EUA	Transversal	Multivariado	No
Shafer et al.	1993	Francia	Transversal	Univariado	No
Plummer et al.	1993	Kenia	Longitudinal	Multivariado	No
Critchlow et al.	1995	EUA	Transversal	Multivariado	No
Moscicki et al.	2001	EUA	Transversal	Multivariado	No
Morrison et al.	2004	EUA	Transversal	Univariado	No

Virus de Inmunodeficiencia Humana

El Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ha llegado a ser una pandemia global. Según datos del 2011, se calcula que 34 millones de personas viven con VIH en el mundo, 2.5 millones de personas contrajeron la infección por VIH y 1.7 millones de personas murieron a causa de enfermedades relacionadas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).¹²⁵

El VIH sólo puede ser transmitido a través del contacto entre fluidos corporales que poseen una alta concentración viral. Existen tres modos principales de transmisión del VIH: a través del contacto sexual, la vía sanguínea y la vía perinatal.^{95,126}

Las relaciones sexuales heterosexuales son la forma de transmisión más importante del VIH, aporta más del 75 % del número acumulado de infecciones con VIH en todo el mundo.²² Estudios epidemiológicos han identificado factores de riesgo que al parecer incrementan la eficiencia de la transmisión heterosexual o adquisición de VIH incluyen eversión glandular, otras enfermedades de transmisión sexual (incluyendo cervicitis por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* y vaginitis por *Tricomonas vaginalis*), la falta de circuncisión, recibir sexo anal y posiblemente el uso de anticonceptivos orales e inmunosupresión relacionada con VIH.^{22,72,81,95}

El VIH tiene como blanco los linfocitos T CD4+, pero también puede infectar monolitos/macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans y células de microglía. La infección por el VIH presenta diversas etapas: fase aguda, fase crónica y SIDA.¹²⁷

Se analizaron 11 estudios con el objetivo de determinar la posible asociación entre la eversión glandular y la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (Tabla 3). 7 estudios reportan una asociación; de los cuales 2 encuentran la asociación empleando un análisis univariado^{84,92} y otros 5 la asociación se mantiene cuando emplean un análisis multivariado.^{22,81,83,92,115} Mientras que en 3 estudios no se encontró asociación entre la eversión glandular y la infección con el VIH; los 3 estudios muestran que no hay asociación empleando un análisis univariado.^{71,75,102} Y 1 estudio muestra una asociación negativa.

El estudio Moss et al.⁸¹ tiene como objetivo evaluar los posibles factores de riesgo en la transmisión de VIH de hombres a mujeres, incluyen a 70 parejas en las cuales los hombres son VIH- seropositivos. La eversión glandular fue observada en el 71% de las mujeres VIH-seropositivas y en el 34% de las mujeres VIH-

seronegativas, al emplear un análisis de regresión logística múltiple encontraron que la eversión glandular es el único factor asociado independientemente con VIH-seropositividad, la presencia de la eversión glandular está asociada a un riesgo 5 veces mayor de VIH-seropositividad en mujeres con una pareja VIH-positiva.

Clemetson et al.²² tomaron muestras cervicales y vaginales de 97 mujeres VIH-seropositivas, encontraron que la frecuencia de VIH en endocérvix es mayor comparada con las muestras de vagina; que la presencia de ADN de VIH en las secreciones cervicales está asociada con la eversión glandular, esta asociación se mantiene al realizar un análisis multivariado y la asociación fue más fuerte para aquellas con un área mayor de eversión glandular.

Plourde et al.⁹² conduce un estudio de cohorte de 134 mujeres VIH-negativas con eversión glandular, las mujeres tuvieron un seguimiento de VIH seroconversión de seis meses. Encontraron que los factores asociados con seroconversión incluían la eversión glandular y también una asociación entre la eversión glandular y un corto periodo de seroconversión. Otro estudio de cohorte realizado por Myer et al.⁸³ en el cual se les da un seguimiento por 36 meses a mujeres VIH-seronegativas. Sus resultados muestran que la eversión glandular que se extiende >20% del cérvix está asociada con aproximadamente el doble de riesgo de seroconversión.

Al analizar los estudios previamente mencionados no podemos aseverar la asociación entre la eversión glandular y la transmisión de VIH, sin embargo, existe una fuerte evidencia que indica dicha asociación. Algunos estudios, muestran resultados que sugieren que la eversión glandular puede ser un factor de riesgo recientemente identificado para la transmisión heterosexual de VIH. Estos resultados requieren investigación adicional, así que, está sigue siendo una investigación abierta.^{22,81,83,92}

Se piensa que la superficie intacta del epitelio forma una barrera natural contra la infección del VIH, lesiones en la mucosa vaginal o cervical han sido sugeridas como el principal mecanismo de entrada del VIH en el tracto

reproductor femenino. El epitelio cilíndrico del endocérnix es delgado, más vascular, sustancialmente más friable y susceptible a la ruptura que el epitelio escamoso del exocérnix y las paredes de la vagina. La eversión glandular es la exposición del epitelio cilíndrico en el exocérnix hace más susceptible al epitelio al trauma o la ruptura lo que puede incrementar potencialmente el riesgo de las mujeres de ser infectadas con el VIH a través del coito.^{22,81,83,92}

Tabla 3. Lista de estudios analizados para determinar la asociación entre Virus de la inmunodeficiencia humana y eversión glandular

Autor	Año	Lugar	Tipo de estudio	Tipo de análisis	Asociación
Moss et al.	1991	Kenia	Transversal	Multivariado	Si
Plourde et al.	1992	Kenia	Transversal	Multivariado	Si
Clemetson et al.	1993	Kenia	Transversal	Multivariado	Si
Plourde et al.	1994	Kenia	Cohorte	Univariado	Si
Nicolosi et al.	1994	Italia	Transversal	Univariado	Si
Miotti et al.	1994	Malawi	Cohorte	Univariado	No
Mati et al.	1995	Kenia	Transversal	Univariado	No
Rugpao et al.	1998	Tailandia	Transversal	Univariado	No
Moscicki et al.	2001	EUA	Transversal	Multivariado	Si (negativa)
Myer et al.	2006	Sudáfrica	Cohorte	Multivariado	Si
Tanton et al.	2011	Tanzania	Cohorte	Multivariado	Si

Citomegalovirus

El Citomegalovirus (CMV) pertenece a la familia *Herperviridae*, como todos los miembros de esta familia es portador de ADN de doble cadena. El único huésped conocido es el humano y la infección es común; los intervalos de seroprevalencia van del 45% al 100%. Y la infección congénita con CMV es la más común en todo el mundo. La mayoría de las infecciones son asintomáticas o auto limitadas en niños y adultos sanos, sin embargo, en individuos inmunocomprometidos puede causar severas complicaciones, las cuales incluyen: neumonía, retinitis y colitis. En los fetos causan pérdida de audición y retraso del neurodesarrollo.^{70,88}

Encontramos un único reporte en el cual al estudiar la relación entre la actividad sexual y la infección con CMV encontraron una asociación entre la presencia de la eversión glandular y la infección con CMV, pero al hacer un análisis multivariado dicha asociación desaparece.²³

2.3 Virus del Papiloma Humano

2.3.1 Características generales y clasificación

Los papilomavirus se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, los papilomavirus han sido reconocidos principalmente en vertebrados superiores y caracterizados en: humanos, ganado, conejos, caballos, perros, ovejas, ciervos, primates, ratones y algunas especies de aves. Los papilomavirus causan lesiones benignas: papilomas o verrugas en sus hospederos naturales y ocasionalmente en especies relacionadas. Sin embargo, algunos papilomavirus han sido implicados en el desarrollo de lesiones malignas. La mayoría de los papilomavirus tienen un tropismo celular específico, las lesiones pueden ser cutáneas o pueden involucrar el epitelio de la mucosa de la oro faringe, el esófago, o el tracto ano-genital. Únicamente un grupo de papilomavirus encontrado en ungulados tiene la capacidad de infectar fibroblastos e inducir lesiones proliferativas o fibropapilomas benignos.^{31,39}

Los papilomavirus habían sido originalmente agrupados junto con los polyomavirus dentro de la familia *Papovaviridae*, debido a que compartían las siguientes similitudes: cápsides icosaedricas no envueltas; genomas de ADN circular de doble cadena; y el núcleo como sitio de replicación del ADN viral y ensamblaje de los viriones. Después se reconoció que tenían diferente tamaño y organización del genoma, y no mostraban homología en la secuencia nucleotídica o de amino ácidos, por lo que actualmente se reconocen 2 familias: *Papillomaviridae* y *Polyomaviridae*.^{31,39}

Los papilomavirus aislados de una especie son clasificados de acuerdo con su homología en la secuencia del ADN. Inicialmente la clasificación de un tipo viral estuvo basada en la extensión de la homología los genomas de ADN usando técnicas de hibridización líquida. Actualmente, la clasificación de tipos es llevada a cabo por la comparación de la secuencia de nucleótidos de regiones específicas. Se reconoce un nuevo tipo de papilomavirus cuando la secuencia nucleotídica de los fragmentos de lectura abiertos (ORFs) **L1**, E6 y E7 difiere por más del 10% de cualquier otro tipo viral conocido, si las diferencias nucleotídicas

se encuentran entre el 2% y 10% se define como un subtipo viral y cuando estas diferencias nucleotídicas son menores al 2% se define como una variante viral. Aunque la clasificación está basada en la homología de la secuencia del ADN, es necesaria la clasificación taxonómica dentro de la familia *Papillomaviridae*. La clasificación tiene como objetivos: establecer la relación entre los tipos de papilomavirus, comparar el término tipo contra los términos taxonómicos "especie" y "genero" (Figura 15).^{31,39}

Más de 100 diferentes tipos de virus del papiloma humano (VPH) han sido identificados. Los 2 principales géneros de VPHs son el Alfa y Beta papilomavirus, a nivel evolutivo los grupos reflejan las diferencias que existen en la biología de los diferentes virus (Figura 15).^{31,39}

El grupo más grande de VPHs corresponde al género Alfa papilomavirus, este supergrupo contiene los VPHs que infectan el tracto ano-genital, algunos virus de este grupo son los VPH-6 y VPH-11, los cuales son unos de los más importantes patógenos de transmisión sexual que se calcula que afecta al 1% de la población mundial y que se encuentran asociados con papilomas benignos. También podemos encontrar otros virus que infectan el tracto ano-genital como el VPH-16 y VPH-18, los cuales causan lesiones en la mucosa que pueden progresar en algunos individuos a una neoplasia de alto grado y cáncer. Dentro de este supergrupo también se incluyen miembros cuyo tropismo primario es por sitios cutáneos, tales como VPH-2 y VPH-10 que son los causantes primarios de las verrugas comunes.^{31,34,35}

El segundo supergrupo más grande de VPHs se encuentra dentro del género Beta papilomavirus. En este género se encuentran los virus de la especie B1 tal como VPH-5 causan infecciones cutáneas inaparentes o latentes en la población general, pero en individuos inmunocomprometidos o que sufren epidermodisplasia verruciforme pueden expandirse de manera incontrolada y se han asociado al desarrollo de cáncer de piel tipo no-melanoma.^{34,35}

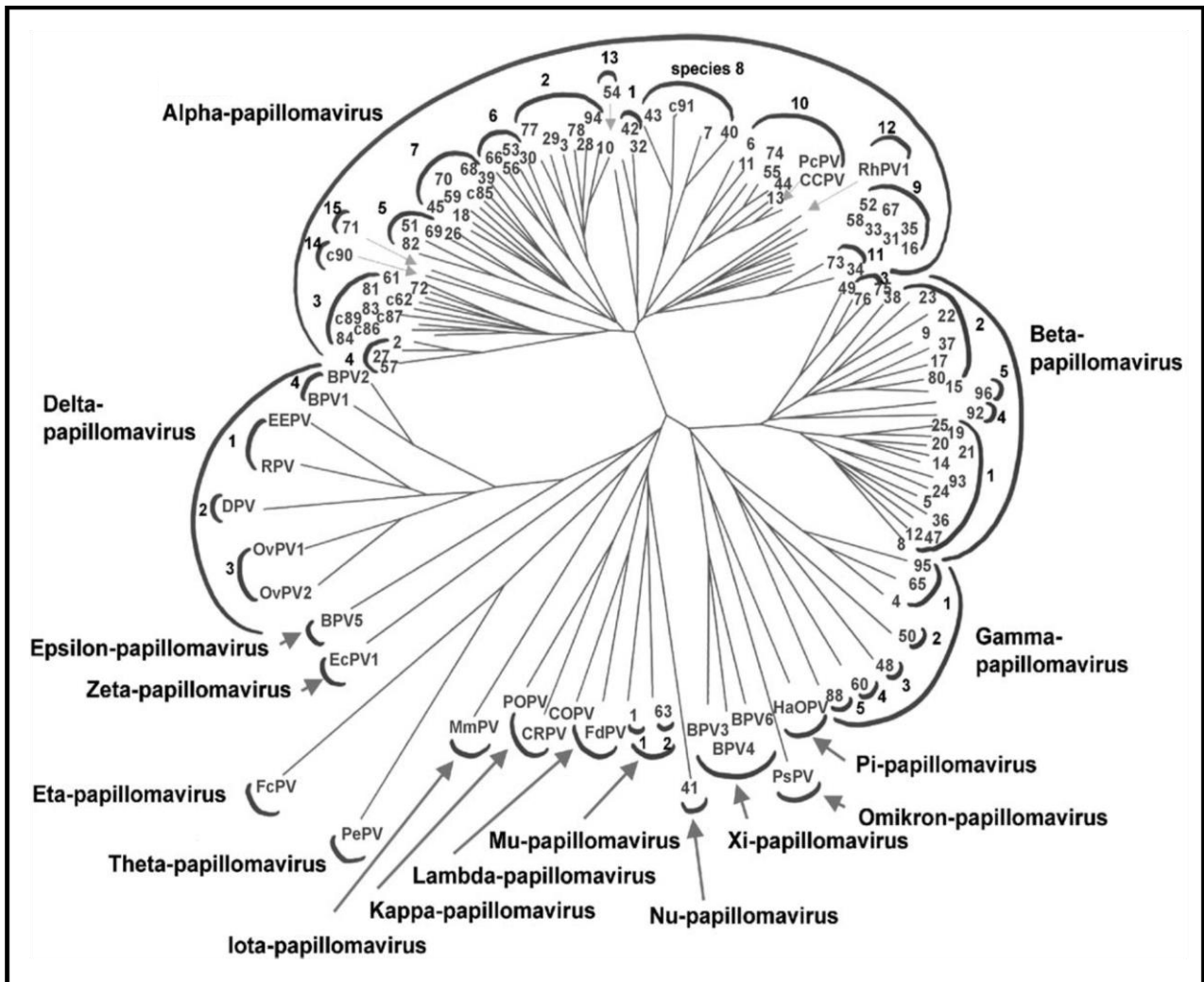


Figura 15. Esquema de un árbol filogenético que contiene la secuencia 118 tipos de papilomavirus. El número al final de cada rama identifica a un tipo de VPH (los que tienen c-número se refieren a un candidato y otras abreviaciones se refieren a tipos animales). Los símbolos semicirculares más externos identifican un supergrupo o género de papilomavirus, podemos observar los géneros Alfa y Beta los cuales contienen aproximadamente al 90% de los VPHs caracterizados. Los símbolos semicirculares internos se refieren a las especies de papilomavirus, la especie 9 está conformada por los tipos VPH-16, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-52, VPH-58 y VPH-67. Tomado de De Villiers. 2004.

Los VPHs han sido clasificados de acuerdo a su genotipo y al potencial oncogénico que presenta cada uno de ellos. Actualmente se han identificado cerca de 40 tipos que pueden infectar el tracto ano-genital, los tipos de VPHs genitales han sido subdivididos en tipos de bajo riesgo, los cuales son encontrados principalmente en verrugas y papilomas; y tipos de alto riesgo, los cuales son frecuentemente asociados con cáncer invasor. El número de tipos de alto riesgo varía de 13 a 19, sólo 11 de ellos son clasificados consistentemente: VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56 y VPH-58; los otros virus que no son consistentemente clasificados como de alto riesgo son: VPH-

50, VPH-53, VPH-59, VPH-64, VPH-66, VPH-68, VPH-73 y VPH-82. Dentro de los tipos de bajo riesgo se encuentran: VPH-6, VPH-11, VPH-40, VPH-42, VPH-43, VPH-44, VPH-54, VPH-61, VPH-70, VPH-72 VPH-81 y CP6108.⁸²

2.3.2 Estructura del virus

Los papilomavirus son virus pequeños, no envueltos, icosaédricos, contienen ADN y se replican en el núcleo de las células epiteliales. Los papilomavirus miden de 52 a 55 nm de diámetro, tienen un coeficiente de sedimentación ($S_{20, W}$) de 300 y una densidad en cloruro de cesio de

1.34 g/mL. Las partículas virales consisten de una sola molécula de ADN circular de doble cadena contenida dentro de una capa de proteína esférica llamada cápside, compuesta por 72 capsómeros. Análisis estructurales por microscopía electrónica con técnicas de reconstrucción de imágenes tridimensionales han revelado que los virus consisten de 72 capsómeros pentaméricos arreglados en una

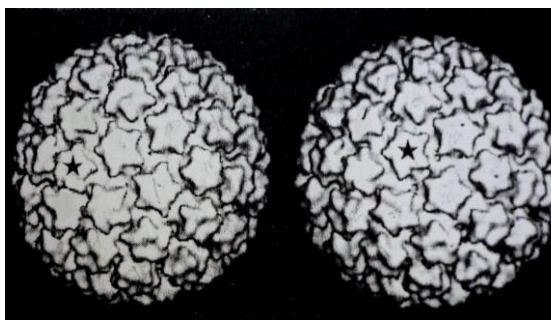


Figura 16. Reconstrucción tridimensional de un análisis microscópico crioelectrónico de la estructura de partículas virales. Los capsómeros individuales pueden existir en un estado pentavalente (izquierda) o hexavalente (derecha). Tomado de Fields, 2007.

conformación $T=7$. Los capsómeros existen en 2 estados: el primer estado es capaz de hacer contacto con 6 vecinos, como se observa en los 60 capsómeros hexavalentes y el segundo estado hace contacto con 5 vecinos en los 12 capsómeros pentavalentes (Figura 16).³⁹

La cápside está conformada por 2 proteínas estructurales: la proteína mayoritaria de la cápside L1 y la proteína minoritaria de la cápside L2. Las partículas tipo virales (VLPs) pueden ser producidas al expresar L1 sola o en combinación con L2, L1 tiene la capacidad de autoensamblarse. La morfología de las VLPs que contienen únicamente L1 parece idéntica a la de las partículas virales intactas. L2 tiene un papel en la encapsidación selectiva del ADN viral y por lo tanto incrementa la infectividad de los papilomavirus.³⁹

2.3.3 Estructura del genoma

Los papilomavirus son virus de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8 000 pb. La organización genética de todos los VPHs es similar, todos los fragmentos de lectura abiertos (ORFs) están localizados en una cadena del ADN viral y el genoma puede ser dividido en tres grandes regiones: una región de control grande no codificante (LCR por Long Control Region), una región temprana (E de Early) y una región tardía (L de Late) basadas en su localización en el genoma. Las tres regiones se encuentran separadas por 2 sitios de poliadenilación (pA): el sitio pA temprano (pAE) y el sitio pA tardío (pAL). En la figura 17 se muestra el mapa genómico del virus del VPH-16.¹²³

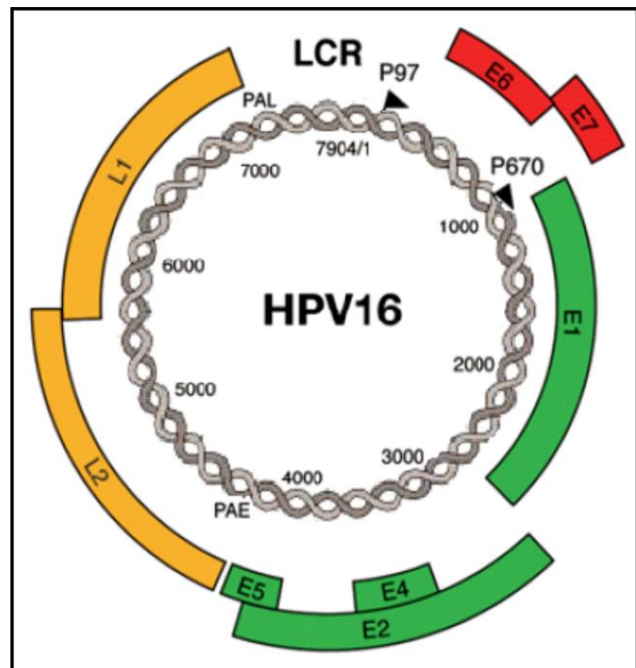


Figura 17. Mapa genómico de VPH-16. Los números dentro del círculo indican la posición de los nucleótidos. Los ORFs tempranos E1, E2, E4 y E5 (verde) y E6 y E7 (rojo). Los ORFs tardíos L1 y L2 (amarillo). Los promotores temprano p97 o tardío p670 son señalados por flechas. Los sitios de poliadenilación PAE y PAL. Tomado de Doorbar, 2006.

La región temprana ocupa más del 50% del genoma del virus y contiene 6 fragmentos de lectura abiertos comunes: E1, E2, E4, E5, E6 y E7; otros 2 ORFs: E3 y E8 fueron inicialmente asignados a esta región, pero sólo E8 de BPV-1 y VPH-31 se ha probado que codifica una proteína. La región tardía cubre casi el 40% del genoma del virus y se encuentra localizada río abajo de la región temprana, en ella se encuentran los ORFs L1 y L2 que dan lugar a las proteínas de la cápside. La región LCR es un segmento de 850 pb que no codifican para una proteína, pero contiene el origen de replicación, múltiples sitios de unión a factores de transcripción y el promotor tardío.¹²³

2.3.4 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo del VPH está ligado con el programa de diferenciación del epitelio infectado. Varios tipos de VPHs producen sólo una lesión productiva después de la infección y no están asociados con cáncer. En tales lesiones, la expresión de proteínas es cuidadosamente regulada, las proteínas virales son producidas en tiempos definidos y a niveles regulados conforme las células infectadas migran hacia la superficie epitelial (Figura 18). Los eventos que dirigen a la síntesis de virus en los estratos superiores del epitelio parecen comunes en ambos tipos VPHs de bajo y alto riesgo.^{34,39,62}

Establecimiento de la infección

La infección inicial requiere que las partículas virales tengan acceso al estrato basal de epitelio, se requiere el rompimiento del epitelio estratificado o microheridas; para virus de alto riesgo como el VPH-16, la formación de lesiones cervicales puede ser facilitada por la infección de las células cilíndricas, las cuales subsecuentemente forman el estrato basal del epitelio estratificado en la zona de transformación.^{34,35}

Hasta el momento existe controversia sobre la naturaleza del receptor para la entrada del virus, sin embargo, varios estudios han sugerido que los proteoglicanos de heparan sulfato pueden tener un papel en la unión inicial de los viriones a la célula. Al parecer los VPHs requieren la presencia de un receptor secundario para una infección eficiente, se ha identificado a la $\alpha 6$ integrina como un posible candidato. El compañero de la $\alpha 6$ integrina debe ser una subunidad β , los papilomavirus pueden unirse a células que expresan cualquiera de los 2 complejos: $\alpha 6\beta 1$ o $\alpha 6\beta 4$, las células con el mayor grado de unión a papilomavirus concuerda con los patrones de expresión de las $\alpha 6\beta 4$ integrinas.^{35,39,82,123}

La internalización de los viriones previamente unidos es un proceso lento que lleva horas y que ocurre a través de la endocitosis de vesículas de clatrina, aunque al parecer este proceso de internalización no es el único. Se ha

observado que el desnudamiento de los viriones puede ser facilitado en los endosomas tardíos o lisosomas, con la transferencia del ADN viral al núcleo.^{34,35}

Mantenimiento del genoma

La infección dirige a la activación de una cascada expresión de genes virales que resulta en el establecimiento del genoma viral, la producción de aproximadamente 20-100 copias extracromosomales del ADN viral o episomas en las células del estrato basal. Entre las primeras proteínas virales que son expresadas se encuentran E1 y E2 (Figura 18). La proteína E2 tiene varios papeles durante la infección productiva, es requerida para el inicio de la replicación del ADN viral y la segregación del genoma. E2 es una proteína de unión a ADN que reconoce el motivo AACCG(N₄)cGGTT en la región LCR, la unión de E2 al ADN es necesaria para el reclutamiento de la helicasa E1 al sitio de origen de replicación viral, la cual a su vez recluta a las proteínas celulares necesarias para la replicación del ADN viral. E2 tiene un papel en el anclaje de los episomas a los cromosomas durante la mitosis y es crítico para la segregación correcta, algunos tipos de VPHs involucran a Brd4 unida al extremo carboxilo terminal de E2. E2 también puede actuar como un factor de transcripción y puede regular al promotor temprano y controlar la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7. A bajos niveles E2 actúa como un activador transcripcional, mientras que a altos niveles E2 reprime la expresión de las proteínas oncogénicas por el desplazamiento del activador transcripcional SP1. La capacidad de E6 y E7 para llevar a las células a la fase S del ciclo celular es necesaria, junto con E1 y E2 para la replicación de los episomas en el estrato basal.^{34,35,62,66}

Estimulación de la proliferación

En un epitelio no infectado, las células basales al dividirse salen del ciclo celular rápidamente después migran hacia el estrato parabasal y llevan a cabo un proceso de diferenciación terminal. En una lesión cervical causada por VPH después de la fase de establecimiento inicial, el ADN viral es replicado de manera coordinada con el ADN celular y los genomas virales son distribuidos en las dos

células durante la mitosis, enseguida de la división celular las células hijas infectadas migran del estrato basal. La proliferación incrementada de las células parabasales epiteliales es atribuida a la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7. Durante la infección la actividad de esas proteínas permite que un número pequeño de células infectadas se expanda y de esa manera incrementar el número de células que producirán viriones. La moderación en la progresión del ciclo celular es perdida, la diferenciación terminal normal es retardada y alterada siendo el cambio más significativo la retención del núcleo. El mecanismo básico por el cual los papilomavirus estimulan la progresión del ciclo celular es a través de las proteínas E6 y E7.^{34,35,62,77,128}

E7 se asocia con Rb (proteína retinoblastoma) y miembros de esta familia de proteínas, lo que provoca la disrupción de la asociación entre Rb y miembros de la familia de factores de transcripción E2F, así, E2F transactiva proteínas celulares requeridas para la replicación como las ciclinas A y E. E7 también se asocia con otras proteínas involucradas en la proliferación celular: deacetilasas de histonas, el complejo de transcripción AP1 y los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27. Durante la infección natural en las células epiteliales diferenciadas, normalmente, la capacidad de E7 de dirigir a la proliferación celular es inhibida dependiendo de los niveles de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27 (Figura 19). La capacidad de promover la entrada en la fase S se puede dar en un subgrupo que tiene bajos niveles de p21/p27 o que expresan niveles altos de E7.^{34,35,62,66}

E6 complementa la función de E7, el papel principal de E6 es la asociación con la proteína supresora de tumores p53, en el caso de los VPHs de alto riesgo forma parte de un complejo trimérico con la ligasa de ubiquitinas celular E6AP, mediando la ubiquitinación y degradación de p53. Se piensa que este evento previene la detención del ciclo celular o la apoptosis que se daría en respuesta a la entrada en la fase S mediada por E7. E6 puede asociarse a otras proteínas pro-apoptóticas incluyendo a Bak y Bax, reforzando el papel de proteína anti-apoptótica de E6. La proteína E6 de los VPHs de alto riesgo tiene también un papel en la proliferación celular de manera independiente de E7 a través de su dominio PDZ-ligando en el C-terminal. La unión de PDZ-E6 es suficiente para

mediar la proliferación celular en el estrato parabasal y puede contribuir al desarrollo tumores metastáticos al romper la adhesión celular normal. Se ha demostrado que E6 y E7.^{34,35,62,66}

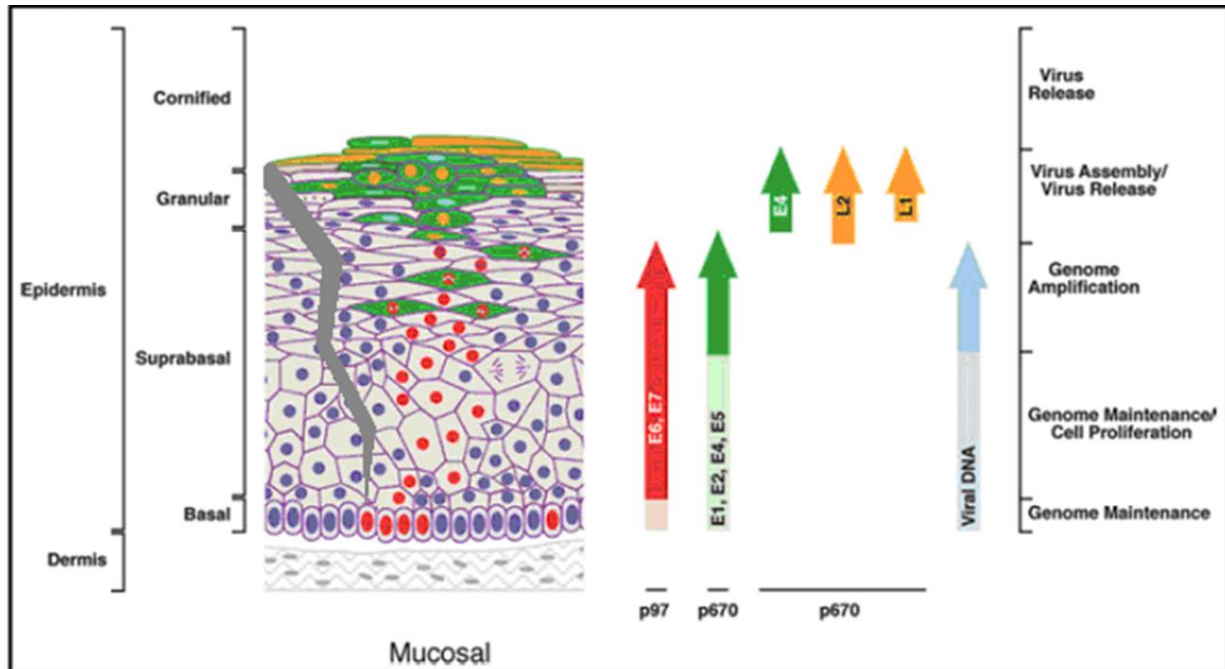


Figura 18. Ciclo replicativo de VPH dentro del epitelio escamoso estratificado. La sincronía de la expresión de las proteínas virales se expresan con las flechas. Las células en el estrato basal con los núcleos rojos son células infectadas. La expresión de las proteínas E1 y E2 necesarias para la replicación del genoma ocurre en células que expresan E6 y E7. La expresión de E6 y E7 en presencia de bajos niveles de E1, E2, E4 y E5 permite el mantenimiento del genoma, un aumento en los niveles de estas proteínas facilita la amplificación del genoma. La expresión de L2 comienza el proceso de empaquetamiento y la expresión de L1 permite la formación de viriones. La acumulación de E4 cerca de la superficie de epitelio mejorar la eficiencia en la liberación de los viriones y finalmente las células que contienen partículas virales son descamadas de la superficie epitelial. Tomada de Doorbar, 2006.

Amplificación del genoma

Para la producción de viriones infecciosos los papilomavirus deben amplificar sus genomas y empaquetarlos dentro de las partículas infecciosas. Para los VPHs del género Alfa ocurre en los estratos medio y superior del epitelio. Aún no se sabe que dispara el comienzo de estos eventos pero parece depender de cambios en el ambiente celular, dado que las células infectadas se mueven hacia la superficie del epitelio. El promotor tardío o dependiente de diferenciación reside dentro del ORF E7 y su sobre-regulación dirige a un incremento en la expresión de las proteínas E1, E2, E4 y E5 involucradas en la

replicación viral. El papel que juegan las proteínas E1 y E2 está bien establecida, E1 se expresa a muy bajas concentraciones y requiere de E2 para unirse eficientemente a sus sitios blanco. La formación del complejo E1-E2 en el origen de replicación induce una distorsión localizada en el genoma viral, con lo cual se facilita el reclutamiento adicional de E1 y el eventual desplazamiento de E2. Al parecer el incremento en la expresión de E2 es importante en la estimulación de la amplificación del genoma viral, lo que lleva a la disminución en la expresión de E6/E7 y la pérdida eventual del ambiente replicativo necesarias para la síntesis del ADN viral.^{34,35}

Las proteínas E4 y E5 también contribuyen a la amplificación del genoma viral. E5 es una proteína transmembranal que se encuentra principalmente en el retículo endoplásmico, pero puede asociarse con la ATPasa vacuolar y retrasar el proceso de acidificación de los endosomas. Se piensa que esto afecta el reciclamiento de los receptores de factores de crecimiento en la superficie celular, dirigiendo al incremento de la señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) y manteniendo un ambiente propicio para la replicación en los estratos superiores del epitelio. El papel de E4 no está bien establecido, E4 se acumula en la célula en el momento de la amplificación del genoma viral. Parte del efecto de E4 está relacionado con su capacidad de asociarse con ciclina B/Cdk2 y re-localizar el complejo al citoplasma, esto previene la acumulación nuclear necesaria para la progresión de la mitosis.^{34,35}

Ensamblaje y liberación de los viriones

El paso final es el empaquetamiento del genoma viral en partículas infecciosas. Las proteínas L1 y L2 se acumulan después del comienzo de la amplificación del genoma viral en los estratos superiores del epitelio. L2 se expresa primero en las células que expresan E4 y después se expresa L1 permitiendo el ensamblaje de las partículas infecciosas. L2 se acumula en el núcleo en unas estructuras conocidas como cuerpos PML (leucemia promielocítica) durante el ensamblaje de las partículas y recluta a L1. L1 se une en capsómeros en el citoplasma antes de ser relocalizados en el núcleo. Los papilomavirus no son virus

líticos, y no son liberados hasta que las células infectadas alcanzan la superficie del epitelio, aunque los papilomavirus son resistentes a la desecación se piensa que su sobrevivencia puede ser aumentada si salen de la superficie epitelial dentro de una escama. Los virus para ser liberados requieren de una forma eficiente de escape de la envoltura cornificada. E4 puede romper la red de queratina y puede afectar la integridad de la envoltura.^{34,35}

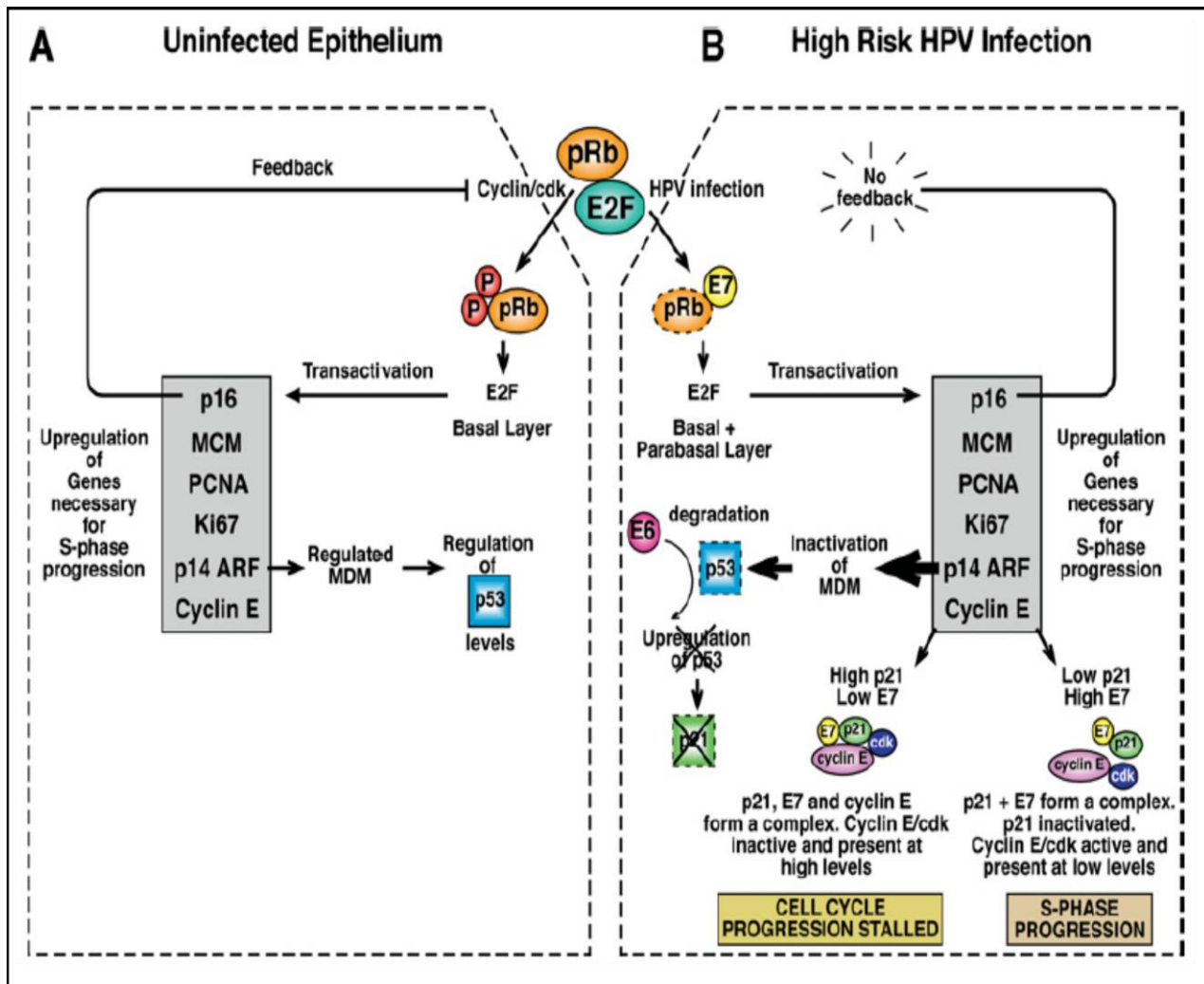


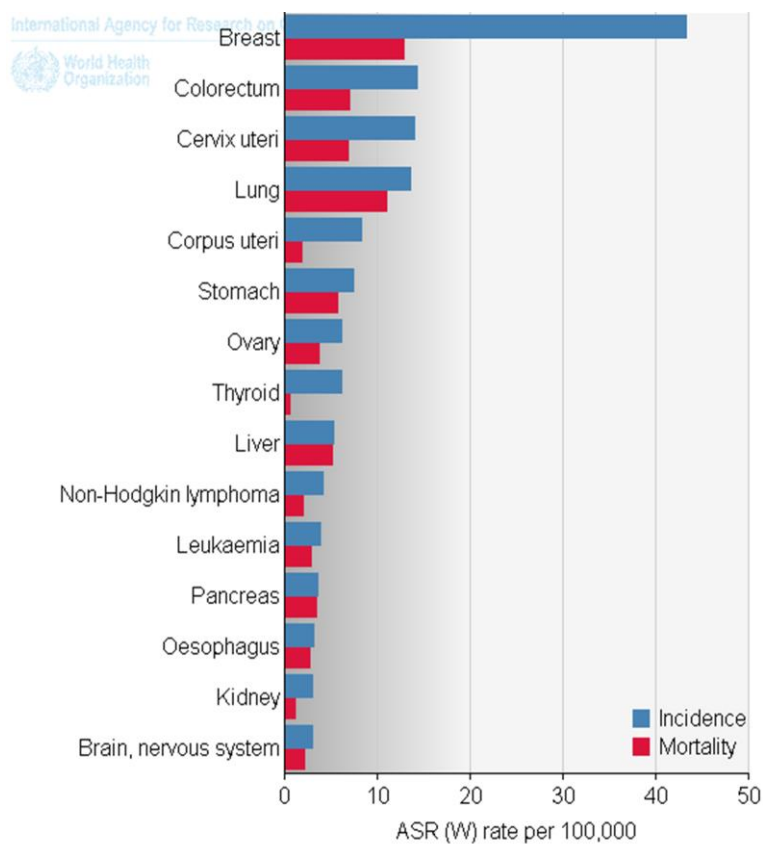
Figura 19. Estimulación de la progresión del ciclo celular. A) en un epitelio no infectado por VPH la expresión de las proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular esta controlada por Rb. En presencia de un factor de crecimiento el complejo ciclina D/Cdk 4/6 es activado, lo cual dirige a la fosforilación de Rb y la liberación de E2F, lo que permite la expresión de proteínas involucradas en la progresión de la fase S. B) en un epitelio cervical infectado con VPH de alto riesgo la progresión en el ciclo celular es estimulada por E7, la cual se une y degrada a Rb, entonces, E2F media la expresión de las proteínas necesarias para entrar a la fase S. El aumento en el nivel de p14^{Arf} dirige a la inhibición de MDM y se incrementa el nivel de p53. Este efecto es contrarrestado por E6, la cual se asocia con E6AP para estimular la degradación de p53 y prevenir el arresto del ciclo celular o la apoptosis. Tomada de Doorbar, 2006.

2.3.5 Virus del papiloma humano y cáncer

Se ha determinado la presencia de VPHs en el 99.7% de los cánceres de cérvix, los papilomavirus de alto riesgo que están asociados más frecuentemente con cánceres humanos se encuentran en los grupos o especies Alfa 9 y Alfa 7 entre los cuales se encuentran VPH-16 y VPH-18 respectivamente que aportan aproximadamente el 70% de los casos.^{34,77}

Estos virus son encontrados en mujeres que no presentan anomalías citológicas, así como en mujeres con LSIL (lesión intraepitelial neoplásica escamosa de bajo grado), HSIL (lesión intraepitelial neoplásica escamosa de alto grado) y cáncer, por tal motivo, actualmente el VPH es considerado el factor etiológico más importante en el desarrollo del cáncer de cérvix. Los cánceres inducidos por estos virus surgen frecuentemente en sitios donde la producción productiva no puede ser soportada.^{34,77}

El cáncer de cérvix representa la tercera neoplasia más común entre las mujeres del mundo, se encuentra por debajo del cáncer de mama y del cáncer colorectal (Gráfica 1). La incidencia del cáncer de cérvix reportada en el año 2012 fue de 527 624 nuevos casos, lo cual representa el 7.9% de todas las neoplasias en las mujeres de todo el mundo. Mientras que en los países en desarrollo es la segunda neoplasia más frecuente precedida por el cáncer de mama.¹²⁸



Gráfica 1. Muestra la incidencia de cáncer y mortalidad de las mujeres a nivel mundial. Podemos observar que el cáncer de cérvix es el tercer tipo de cáncer más común. GLOBOCAN, 2012.

El tipo histológico más común del cáncer de cérvix es el carcinoma de células escamosas el que aporta aproximadamente el 80-85% de los casos de cáncer de cérvix, este tipo histológico surge en la unión escamocolumnar, es decir, entre el epitelio escamoso y el epitelio columnar del endocérvix. El adenocarcinoma aporta el 10-15% de los casos y se deriva de la mucosa endocervical. Aunque el adenocarcinoma es menos frecuente su prevalencia ha sido incrementada del 5% en 1950-2960 al 20-25% en varias regiones del mundo, principalmente en las mujeres jóvenes; mientras que la incidencia del carcinoma de células escamosas ha disminuido. Se ha reportado que la presencia de VPH en el carcinoma de células escamosas es constantemente >90-95%, sin embargo, la prevalencia de VPH reportada para el adenocarcinoma varía significativamente del 32% al 100% dependiendo del método usado para la detección. El VPH tipo 16 y 18, aunque con distintas tasas de prevalencia, fueron los tipos virales más comunes en el cáncer de cérvix en todo el mundo. El VPH-16 es el tipo más común en el carcinoma de células escamosas, mientras que el VPH 18 es el tipo que predomina en el adenocarcinoma.^{3,90,118}

La infección abortiva en la progresión del cáncer

La mayoría de las mujeres infectadas con un tipo específico de VPH no muestran evidencia de la infección de 6 a 12 meses después de la exposición.¹⁰¹ Las infecciones con VPHs de alto riesgo duran de entre 12-18 meses y son eventualmente eliminadas. Sin embargo, aproximadamente el 10% de las mujeres infectadas no logran eliminar la infección, resultando en una infección persistente. La persistencia con los VPHs de alto riesgo por largos periodos es el factor de riesgo más importante para el desarrollo del cáncer.^{6,35,77,10}

Los conceptos de displasia, neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y lesión escamosa intraepitelial (SIL) representan diferentes denominaciones para identificar la transformación maligna gradual de los epitelios del exocérvix. El término displasia significa crecimiento anormal, implica una alteración de las características morfológicas y se clasifica en leve, moderada y severa. El término es ampliamente utilizado para describir los resultados de un frotis citológico

teñidos con la técnica de Papanicolao. Las NIC son definidas como una gama de alteraciones intraepiteliales, el grado de NIC es caracterizado de acuerdo al grado de alteración morfológica estructural en el epitelio: NIC1 solo a las células en el tercio basal del epitelio, NIC2 con afectación a los dos tercios inferiores y NIC3 con imagen de todo el espesor del epitelio de células basaliodes indiferenciadas no estratificadas. El diagnóstico de NIC

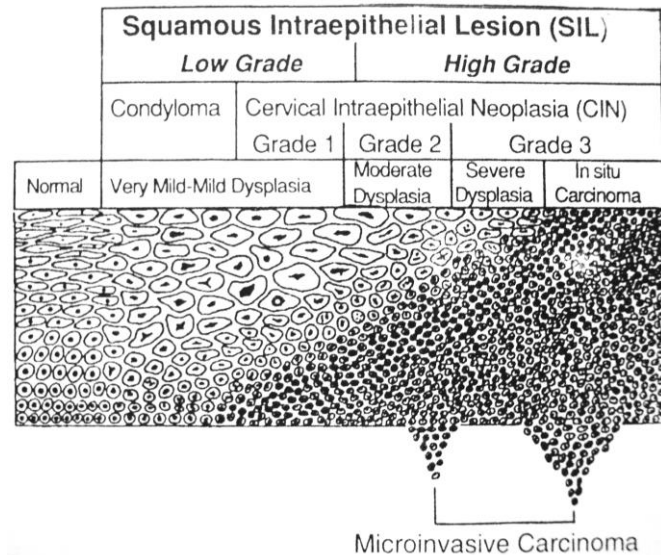


Figura 20. Representación esquemática de los precursores del cáncer cervical y las diferentes terminologías que han sido empleadas para referirse a ellos. Tomada de Fields, 2007.

se establece mediante la obtención de un tejido. SIL corresponde a una nueva clasificación de alteraciones intraepiteliales cervicales propuesta por el Sistema Bethesda en la cual engloban tanto imágenes de frotis como de biopsias y se divide en: SIL de bajo grado (LSIL) y SIL de alto grado (HSIL) (figura 20).³⁹

Las lesiones que progresan hacia un cáncer invasor pueden iniciar como lesiones con una displasia de bajo grado y llegar a ser más displásicas con el tiempo. Sin embargo, la progresión maligna nos es un resultado inevitable, las lesiones en cualquier estadio antes del desarrollo de un cáncer invasor pueden fracasar en la progresión o pueden revertir, aunque la probabilidad de regresión esta inversamente relacionada con el grado de displasia.³⁹

Los VPHs de alto riesgo pueden producir tumores en sitios donde su ciclo replicativo no puede ser completado, el cáncer cervical está compuesto por células que han perdido su capacidad de diferenciarse y el fenotipo diferenciado es necesario para la replicación productiva. Las lesiones cervicales de bajo grado (CIN1 o LSIL) tienen patrones de expresión de genes virales similares a una infección productiva y se pueden detectar las proteínas de la cápside en la superficie epitelial. En las lesiones de alto grado (NIC2 y 3 o HSIL) presentan una fase proliferativa más extensa, mientras que las fases productivas del virus son pobremente soportadas. En el cáncer invasor fases productivas del ciclo

replicativo del VPH no son soportadas y los episomas virales normalmente son perdidos (Figura 21). En las lesiones de bajo grado la mayoría de los genomas del VPH persisten de una forma episomal, mientras que la mayoría de las lesiones de alto grado y en cáncer el genoma del VPH se encuentra integrado en los cromosomas del huésped. Más de la mitad de los cánceres VPH-16 positivos y la mayoría de los cánceres VPH-18 positivos contienen genomas de VPH integrados. Así, en los carcinomas cervicales VPH-16 positivos se ha encontrado que aproximadamente el 70% contienen únicamente genomas integrados y 20 % contienen copias tanto episomales como integradas y sólo el 10% tienen exclusivamente genomas episomales. Por cual se sugiere que el proceso de integración juega un papel muy importante en la progresión maligna, el genoma del VPH debe encontrarse de manera episomal para llevar a cabo una replicación productiva. Existen estudios que indican que un paso importante en la carcinogénesis puede ser la coexistencia del genoma del VPH episomal e integrado. La integración del genoma del VPH normalmente interrumpe la expresión de los genes E1 y E2, dirigiendo a la expresión desregulada de E6 y E7. Estas proteínas por si mismas contribuyen a la acumulación de mutaciones en el genoma celular al promover inestabilidad genómica durante una infección persistente, E6 y E7 inducen anomalías centrosomales resultando en una segregación anormal de cromosomas y aneuploidia.^{34,35,39,62,77}

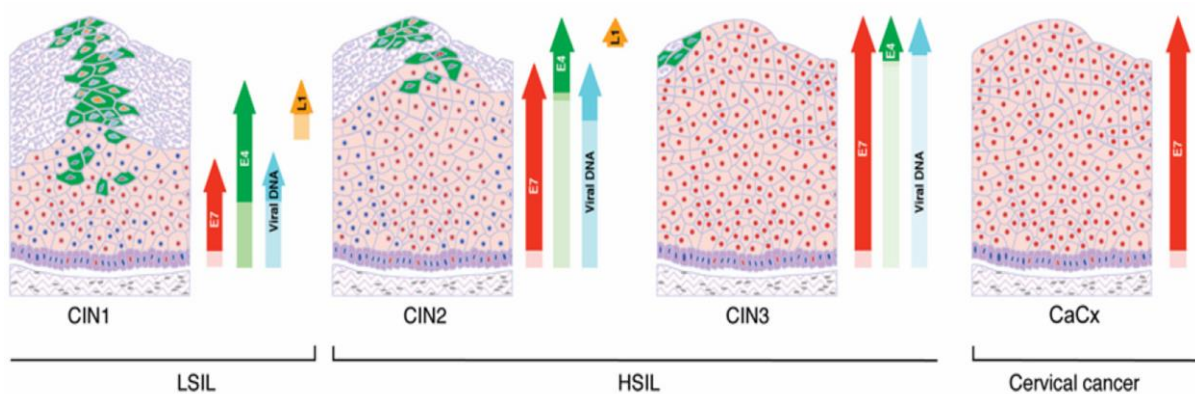


Figura 21. Modelo de expresión de las proteínas de VPH en el epitelio cervical. Durante la progresión del cáncer cambian los patrones de expresión de las proteínas virales: en las lesiones tempranas (LSIL o NIC1) la expresión de proteínas es similar a la mostrada por las células que tienen lesiones productivas; en las lesiones avanzadas (HSIL o NIC2 y 3) el orden de los eventos de expresión de proteínas están alterados se mantiene la expresión de E6 y E7, mientras que la producción de viriones es restringida a áreas cada vez más pequeñas y cercanas a la superficie epitelial. En el cáncer cervical se da una proliferación abortiva. Tomado de Doorbar, 2006.

3. Antecedentes

3.1. Eversión glandular y virus del papiloma humano

Toon et al.¹¹⁷ en 1986 realizaron un estudio transversal en el cual incluyeron 210 mujeres divididas en 2 grupos: el primer grupo conformado por 106 mujeres con cambios inflamatorios no-específicos en el cérvix (media 29.1 años); y el segundo grupo conformado por 104 mujeres quienes mostraban un cérvix normal (media 36.9 años). Se obtuvieron biopsias de la zona de transformación y por medio de hibridación de ADN se determinó la presencia de VPH, usando inicialmente una mezcla que contenía ADN de los tipos 1, 2, 4, 6, 10, 16 y 18. En el primer grupo se encontraron 13 mujeres (12.26%) que histológicamente presentaban neoplasia intraepitelial cervical; mientras que en el segundo grupo ninguna mujer mostró evidencia de neoplasia intraepitelial cervical. Los resultados obtenidos al realizar la hibridación de ADN mostraron que 24 de las 106 mujeres (22.64%) del primer grupo fueron VPH positivas: 12 (50%) de ellas pertenecían a la categoría de NIC, 7 (29.1%) mostraban una eversión glandular cervical y el resto tenían una imagen de proceso inflamatorio; 16 (66.66%) fueron positivas para VPH-16, 2 (8.3%) fueron positivas para el VPH-11, 1 (8.3%) que tenía una mezcla y el resto no pudo ser identificado. En el segundo grupo se observó una positividad a VPH en 12 mujeres (11.5%): 7 (58.3%) mostraban una eversión glandular cervical; en este grupo se determinó la presencia de VPH-16 en 5 mujeres (71.4%) y en las 2 restantes no se pudo determinar el tipo viral. Un hallazgo muy interesante en este estudio fue que de las 47 mujeres que mostraban una imagen colposcópica de eversión glandular la presencia de VPH fue positiva en 14 mujeres (29.78%): 7 (25%) en el primer grupo y 7 (36.8%) en el segundo grupo. Ellos proponen que posiblemente el VPH sea albergado en las eversiones glandulares cercanas a la unión escamo-columnar después de la transmisión en las mujeres sexualmente activas. Y que esta activamente involucrado en la zona de transformación, lleva a cabo un proceso de metaplasia, lo cual, podría facilitar la entrada del VPH en las células y entonces iniciar el proceso de neoplasia intraepitelial.

En el estudio realizado por Duttagupta et al.³⁷ en el año 2002, cuyo objetivo era determinar el costo-efectividad de un sistema de búsqueda basado en papilomavirus oncogénicos para prevenir el cáncer de cérvix en mujeres de la India. Se enrolaron un total de 850 mujeres casadas de 14 a 80 años de edad y se les realizó un papanicolau, una inspección visual con ácido acético al 4% y una PCR para la región E6 de HPV 16/18, el tipo viral fue confirmado por digestión. Sus resultados muestran que la prevalencia de la infección con VPH es mayor en las mujeres jóvenes (≤ 23 años) y menor en las mujeres mayores de 44 años; también observaron que la presencia de lesiones citológicas de bajo grado (LSIL) incrementa conforme se incrementa la edad. En este estudio se determinó la presencia de la eversión glandular en 379 mujeres, cuando analizaron la asociación con la infección con VPH encontraron que cuando consideraban todos los grupos de edad había una asociación estadísticamente significativa entre la infección con VPH y la presencia de eversión glandular.

Castle et al.¹⁷ en un estudio cuyo propósito era saber cuándo diferían en su afinidad por la zona de transformación los tipos HPV no-carcinogénicos de los HPV-carcinogénicos y examinaron evidencia epidemiológica para probar que la eversión glandular influenciaba los patrones de prevalencia de los tipos de VPH en mujeres no histerctomizadas. En el estudio se incluyeron 8374 mujeres a las que se les realizó un examen pélvico y la toma de una muestra citológica, por medio PCR se determinó la positividad para VPH y la tipificación se realizó por hibridación. Los resultados que obtuvieron fueron: 633 mujeres positivas para VPH $\alpha 9$ de las cuales 77 fueron positivas para más de un tipo; 634 mujeres fueron positivas para VPH $\alpha 3/\alpha 15$ de estas 64 fueron positivas a más de uno de estos tipos virales. Al hacer las curvas de prevalencia de acuerdo a la edad para cada grupo viral observaron que los grupos muestran diferentes patrones: para el grupo VPH $\alpha 9$ la prevalencia tiene un pico en las mujeres jóvenes y un pico secundario menor en mujeres de 55-64 años; mientras que para el otro grupo VPH $\alpha 3/\alpha 15$ la prevalencia es relativamente constante o puede incrementar conforme incrementa la edad. Se seleccionó un subgrupo de 945 mujeres: 534 infectadas con VPH $\alpha 9$ y 513 infectadas con VPH $\alpha 3/\alpha$ y se les realizó un análisis de imagen del cérvix para examinar la relación entre el grado de eversión glandular con la

detección de esos grupos. Los resultados observados en este subgrupo de mujeres muestra una fuerte tendencia positiva, es decir, hay un incremento en la positividad a VPH $\alpha 9$ cuando es mayor el grado de la eversión glandular; mientras que para el grupo VPH $\alpha 3/\alpha 15$ hay una correlación positiva entre la positividad para VPH $\alpha 3/\alpha 15$ y menores grados de eversión glandular. Así que encontraron una tendencia de incremento en la detección de VPH $\alpha 9$ y un decremento en la detección de VPH $\alpha 3/\alpha 15$ con el incremento de la eversión glandular. Entre los resultados que mencionan dicen que el grupo VPH $\alpha 7$ (en el cual se encuentra VHP-18) muestra un comportamiento similar, sin embargo, la asociación positiva entre el incremento en la positividad a VPH $\alpha 7$ y el aumento en el grado de la eversión glandular es menos fuerte que la observada por el grupo VPH $\alpha 9$.

En la Clínica de Displasias del Colegio Mexicano de Colposcopistas: "Fundación Cruz-Talonia", el Dr. Fernando Cruz-Talonia había observado que un gran número de mujeres que acudían por tener una infección por VPH habían tenido un diagnóstico previo de eversión glandular.

En nuestro laboratorio la Dra. Leticia Rocha Zavaleta realizó un estudio cuyo objetivo era investigar en mujeres con eversión glandular la prevalencia del VPH y en particular el VPH-16, debido a que es el tipo viral más común asociado a cáncer de cérvix. La prevalencia de VPH se determinó por medio de PCR con los oligonucleótidos generales MY9/MY11 y la determinación del tipo viral VPH-16 fue realizada por PCR empleando los oligonucleótidos Pr3/Pr4. La Dra. Rocha encontró que la prevalencia de VPH en mujeres con eversión glandular era de 23.3%, siendo 1.8 veces mayor comparado con las mujeres del grupo control negativo (las cuales tienen un diagnóstico citológico y colposcópico normal o sano, sin evidencia de IVPH o EG); también encontraron que la prevalencia de VPH en las mujeres con eversión glandular es menor que la determinada en el grupo de mujeres con diagnóstico de una lesión asociada a VPH (72.9%). Cuando analizaron específicamente presencia del VPH-16 encontraron que la prevalencia en las mujeres con eversión glandular era de 6.8%, es decir, 6.3 veces mayor a la determinada en el grupo control, pero menor a la encontrada en el grupo de mujeres con diagnóstico de una lesión asociada a VPH (35.1%), todas las diferencias son estadísticamente significativas.¹⁰⁰

4. Justificación

Gracias a la implementación de la prueba de Papanicolau a partir de los 70's la incidencia del cáncer de cérvix ha disminuido de manera considerable, sin embargo, a pesar de esta disminución se puede observar un incremento en el número de casos de cáncer de cérvix del tipo adenocarcinoma. El adenocarcinoma se considera generalmente un tipo de cáncer más agresivo debido a que ocurre frecuentemente en mujeres jóvenes menores de 40 años.

La evolución y desarrollo del carcinoma de cérvix ha sido ampliamente estudiada, se pueden observar lesiones precursoras que muestran una progresión gradual del avance de la enfermedad denominadas LSIL y HSIL; y se reconoce al virus del papiloma humano como el factor etiológico para el desarrollo del cáncer. Sin embargo, el conocimiento del desarrollo del adenocarcinoma es menos conocido y sólo se reconoce una lesión precursora: el adenocarcinoma *in situ*, que como su nombre bien lo indica es un cáncer que aún no invade el estroma circundante. Desafortunadamente, la detección temprana no es posible debido a su localización y a que no se conoce una lesión pre-maligna. Es por este motivo que consideramos necesaria la investigación del epitelio cilíndrico que es el epitelio donde se origina el adenocarcinoma para buscar cambios que pudiesen indicar un proceso de transformación (previo al tejido transformado del adenocarcinoma *in situ*).

Se sabe que la eversión glandular es la exposición del epitelio cilíndrico del endocérvix hacia el exocérvix, es decir, las células donde se origina el adenocarcinoma. Debido a que el VPH es considerado el agente etiológico para el desarrollo del cáncer, entonces, decidimos que es importante evaluar su presencia en la eversión glandular. Adicionalmente, existen reportes que indican una asociación entre la presencia de la eversión glandular y algunas enfermedades de transmisión sexual; dado que la infección con el VPH es una enfermedad de transmisión sexual importante, en este trabajo planteamos investigar si las células cilíndricas expuestas en la eversión glandular son frecuentemente infectadas por el VPH, y en particular por tipos de alto riesgo.

Si la eversión glandular muestra una presencia de VPH mayor a la reportada en el cérvix sano, entonces, deberíamos de analizar cuáles son los tipos virales más frecuentes. Sí los tipos virales más frecuentes son de alto riesgo, entonces, deberíamos buscar cambios que indicasen una transformación maligna.

Con estos resultados tendríamos los argumentos suficientes para en primera instancia proponer que a las mujeres que se les diagnostica una eversión glandular se les haga en un seguimiento riguroso, pues existe para ellas un riesgo mayor de desarrollar cáncer de cérvix, en particular de tipo adenocarcinoma. En segunda instancia, también, serviría como argumento para hacer un estudio prospectivo para determinar la proporción de mujeres que evolucionaron a un carcinoma y entonces, pensar en realizar algún tratamiento de rutina para evitar que la eversión glandular evolucione a un carcinoma.

5. Hipótesis

Debido a que el epitelio cilíndrico evertido hacia el exocérnix conocido como eversión glandular, está asociado con infecciones de transmisión sexual, entonces, dicho epitelio puede ser infectado por Virus del Papiloma Humano.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general:

Determinar la presencia del Virus del Papiloma Humano y la prevalencia de los tipos virales en la eversión glandular.

6.2. Objetivos particulares:

- Evaluar si las diferencias en la prevalencia de VPH son debidas a los factores de riesgo asociados a VPH.
- Determinar la presencia de VPH en biopsias de tejido glandular de pacientes con diagnóstico de eversión glandular.
- Identificar los genotipos virales presentes en estas biopsias con tejido glandular.
- Determinar la presencia de infecciones múltiples en las eversiones glandulares del cérvix.
- Evaluar la presencia de cambios que indiquen una posible transformación maligna.

7. Metodología

7.1. Población de estudio

La población de estudio fue seleccionada de mujeres atendidas en el Centro Nacional de Clínica de Displasias (CENACLID), del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" y en la Clínica de Displasias del Colegio Mexicano de Colposcopistas: "Fundación Cruz-Talonia". En estas clínicas se brinda servicio ginecológico a mujeres referidas para una colposcopia debido a una citología anormal o mujeres con citología normal con síntomas ginecológicos tales como la descarga vaginal anormal, sangrados intermenstruales y sangrados post-coitales o mujeres que se realizan un examen de rutina. En este estudio se incluyeron 349 mujeres, todas las mujeres fueron informadas y consintieron formar parte de este estudio. Complementariamente se les realizó un breve cuestionario para evaluar los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de cérvix asociado a VPH (figura 22). A todas las mujeres se les realizó un análisis histopatológico y colposcópico. Basados en el diagnóstico se formaron 3 grupos: Eversión Glandular (EG), Infección con VPH (IVPH) y Endocérvix "Sano".

Los criterios de inclusión para formar parte del estudio fueron:

- Haber consentido formar parte del estudio.
- NO haber tenido un diagnóstico previo de infección con VPH.
- NO haber recibido un tratamiento previo del cérvix con electrocirugía o crioterapia.
- NO haber tenido cáncer de cérvix.
- Tener un diagnóstico colposcópico e histopatológico de:
Eversión Glandular, Infección con VPH o Sano.

Del grupo de eversión glandular se tomaron biopsias dirigidas colposcópicamente, el cérvix de estas mujeres después de 30-60 segundos de la aplicación del ácido acético al 5% mostraba la presencia de una zona rojiza periorificial con la apariencia de un racimo de uvas, las biopsias fueron tomadas

precisamente de esta región. También se tomaron biopsias dirigidas colposcópicamente del grupo de infección con VPH (IVPH), en este grupo después de 30-60 segundos de la aplicación del ácido acético el cérvix mostró cambios que sugieren una lesión asociada a VPH: lesiones acetoblancas delgadas y planas con bordes irregulares el punteado fino y el mosaico fino que son indicativas de una NIC1 de bajo grado (correspondiente a una LSIL), las biopsias fueron tomadas de las lesiones acetoblancas. Y a las mujeres del grupo Endocérnix "sano", es decir aquellas mujeres cuyo cérvix después de 30-60 segundos de la aplicación del ácido acético mostraban una colposcopia satisfactoria sin evidencia de Infección con VPH, Eversión Glandular, metaplasia o inflamación se les realizó un cepillado en el canal cervical.

No. De expediente: _____

Nombre: _____ Edad: _____

Estado civil: _____

Edad de la menarca: _____

Edad de la primera relación sexual: _____ No. de parejas sexuales: _____

No. de embarazos: _____ No. de hijos: _____ Edad de los hijos: _____

Método anticonceptivo: _____ Tiempo de uso: _____

Antecedente de infección por VPH? _____

Se ha realizado PAP? _____ Fecha/Diagnóstico? _____

Fuma? _____ Cuántos cigarros al día? _____ Por cuántos años? _____

Bebe? _____ Cada cuando bebe? _____ Por cuántos años? _____

Figura 22. Cuestionario para determinar los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de cérvix.

Las biopsias fueron transportadas de la clínica al laboratorio en PSB a 4°C. El procesamiento inicial de las biopsias se llevó a cabo el mismo día: primero se realizó la eliminación del tejido dañado por la corriente eléctrica, seguido por 3 lavados con PBS y la partición de la muestra en 2 porciones: la primera porción fue colocada en PBS y almacenada a -20°C y la segunda porción fue colocada en etanol al 70% y almacenada a -20°C. Las muestras tomadas empleando la técnica de cepillado del endocérnix el cepillo se introdujo en un tubo que contenía PBS 1X y fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

7.2. Extracción del ADN

Para la extracción de ADN se empleó la porción de las biopsias almacenadas en PBS a -20°C y se realizó empleando la técnica Fenol:Cloroformo. Siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. Lavar 3 veces con PBS1X (para eliminar residuos de etanol)
2. Cortar la biopsia en trozos lo más pequeños posible
3. Agregar 400 μl de buffer de digestión:
4. Añadir 5 μl de proteínasa K (16.5 mg/ml):
5. Agitar con vórtex
6. Incubar toda la noche a 42°C
7. Centrifugar por 5 minutos a 10000 rpm.
8. Agregar 1 volumen (400 μl) de una solución Fenol:Cloroformo (1:1) y agitar con vórtex
9. Centrifugar 5 minutos a 12500 rpm. Recuperar la fase acuosa (superior) y pasarla a un tubo nuevo.
10. Agregar 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y dar vórtex hasta formar una emulsión.
11. Centrifugar 10-15 segundos a 12500 rpm. Recuperar la fase acuosa (superior) y pasarla a un tubo nuevo.
12. Precipitar agregando 1 ml de etanol al 96%, agitar con suavidad y observar la formación de hilo de ADN.
13. Incubar a -20°C toda la noche.
14. Centrifugar 5 min a 12500 rpm. Desechar el sobrenadante y secar.
15. Resuspender en 50 μl de agua ultrapura (libre de DNasas y RNasas)

Para la extracción del ADN de las muestras obtenidas por el cepillado del endocérnix se utilizó el equipo de extracción de ADN: QIAmp DNA Micro Kit de Qiagen Inc., Valencia, CA. Siguiendo el protocolo establecido por el proveedor.

7.3. PCR para el gene β -globina

A todas las muestras se les realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés; Polymerase Chain Reaction) para determinar que el ADN obtenido tenía la calidad para poder ser amplificado. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de β -globina fueron GH20 5'GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'y PC04 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3', los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 260 pb. En cada reacción se tuvo una concentración final de: buffer 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 1 mM, PC04 0.5 pM, GH20 0.5 pM, Taq Polimerasa 1 U y 100 ng de ADN. Ajustando a un volumen total de 20 μ l con Agua Ultrapura.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador empleando el siguiente programa:

94°C	10 minutos	
94°C	40 segundos	} 38 ciclos
55°C	40 segundos	
72°C	55 segundos	
72°C	7 minutos	

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UltraVioleta (UV).

7.4. PCR con MY09/MY11

El AND viral se amplificó empleando los oligonucleótidos universales MY09 (5' CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3') y MY11 (5' GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3'), los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 450 pb. En cada reacción se tuvo una concentración final de buffer 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 2.25 mM, MY09 0.5 pM, MY11 0.5 pM, HMB01 0.5 pM, Taq gold polimerasa (Roche) 1 U y 100 ng de ADN. Ajustando a un volumen total de 20 μ l con Agua Ultrapura.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador empleando el siguiente programa:

94°C	10 minutos	
94°C	50 segundos	} 38 ciclos
55°C	50 segundos	
72°C	55 segundos	
72°C	7 minutos	

Los productos de la PCR se corrieron en un en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en una camara de electroforesis con TBE 1X y visualizados en un transiluminador de luz UV.

7.5. PCR con LC1/LC2

Se realizó una segunda PCR a aquellas muestras negativas a VPH empleando los oligonucleotides universals MY09 y MY11. En esta segunda PCR para determinar la presencia del virus se emplearon los oligonucleótidos universales L1C1 (5' CGT AAA CGT TTT CCC TAT TTT TTT 3') y L1C2 (TAC CCT AAA TAC TCT GTA TTG 3'). Para cada reacción colocamos una concentración final de buffer 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 2.0 mM, L1C1 0.5 pM, L1C2 0.5 pM, Taq gold polimerasa (Roche) 1 U y 100 ng de ADN. Ajustando a un volumen total de 20 µl con Agua Ultrapura.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador empleando el siguiente programa:

94°C	10 minutos	
94°C	50 segundos	} 38 ciclos
49°C	50 segundos	
72°C	55 segundos	
72°C	7 minutos	

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio usando como buffer TBE 1X y visualizado en un transiluminador de luz UV.

7.6. PCR con PR3/PR4

En la reacción en cadena de la polimerasa se emplearon los oligonucleótidos específicos para VPH-16: PR3 (5' GTC AAA CAC TGT GTC CT 3') y PR4 (5' CCA TCC ATT ACA TCC CGTAC 3'), cuyo producto de amplificación es de aproximadamente 500 pb. Para cada reacción se colocó una concentración final de buffer 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 1.25 mM, PR3 0.5 μM, PR4 0.5 μM, Taq polimerasa 1 U y 100 ng de ADN. Ajustando a un volumen total de 20 μl con Agua Ultrapura.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador empleando el siguiente programa:

94°C	5 minutos	} 40 ciclos
94°C	30 segundos	
54°C	60 segundos	
72°C	90 segundos	
72°C	10 minutos	

Los productos de la PCR con los oligonucleótidos específicos para VPH-16 se cargaron en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y se corrieron en una cámara de electroforesis con TBE1X como el buffer de corrida. Los geles se visualizaron en un transiluminador de UV.

7.7. PCR con VPH18F/HPV18R

Para la determinación del VPH-18 se emplearon los oligonucleótidos específicos para este tipo viral: HPV18F (5' AAG AAA ACG ATG AAA TAG ATG 3') y HPV18R (5' GGC TTC ACA CTT ACA ACA CA 3'), los cuales amplifican un fragmento de 100 pb. dentro de E7. Para cada reacción se colocó una concentración final

de buffer 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 1.25 mM, HPV18F 0.5 μM, HPV18R 0.5 μM, Taq polimerasa 1 U y 100 ng de ADN. Ajustando a un volumen total de 20 μl con Agua Ultrapura.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador empleando el siguiente programa:

94°C	5 minutos	
94°C	30 segundos	} 30 ciclos
53°C	60 segundos	
72°C	90 segundos	
72°C	10 minutos	

Los productos de la PCR se corrieron en un en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en una camara de electroforesis con TBE 1X y visualizados en un transiluminador de luz UV.

7.8. Secuenciación

La secuenciación directa de los productos positivos de los productos de la PCR con los oligonucleótidos universales MY09/MY11 o L1C1/L1C2. La limpieza y purificación se realizó con Exo-SAP-IT (USB Corp. Cleveland, OH) y sometióndolas en un termociclador a 37°C durante 15 minutos y a 80°C durante 15 minutos más. El ciclo de secuenciación se realizó con el equipo: ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada reacción se realizó de la siguiente manera:

Buffer para secuencia 5X	0.75 μl
BigDye	0.5 μl
Primer de secuencia:	
MY11 o L1C1 (10 mM)	0.5 μl
PCR purificada con Exo-SAP-IT	1-2 μl
Ajustar a 10 μl con H ₂ O UltraPura	

La reacción se llevó a cabo en un termociclador empleando el siguiente programa:

94°C	5 minutos	
94°C	10 segundos	} 25 ciclos
53°C	10 segundos	
72°C	4 minutos	
60°C	7 minutos	

El producto de esta reacción fue limpiado como se detalla a continuación:

1. Agregar 30 µl de H₂O + 60 µl de isopropanol y centrifugar a 13000 rpm. por 25 minutos.
2. Eliminar el sobrenadante, agregar 250 µl de etanol 70% y centrifugar a 13000 rpm. por 10 minutos.
3. Secar, resuspender en 20 µl de formamida y agitar.
4. Colocar a 96°C por 5 minutos.

El producto de la PCR de secuencia limpia fue analizado en el secuenciador: ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los alineamientos de secuencia fueron realizados usando el programa BLAST (Basis Local Alignment Search Tool) dentro del servidor de GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information); los tipos virales fueron identificados cuando tenían más del 98% de homología en la secuencia.

7.9. PCR múltiple anidada

Las infecciones múltiples con VPH se determinaron usando la PRC múltiple anidada¹⁰⁹, como se describe a continuación: las muestras se sometieron a una primera amplificación utilizando los oligonucleótidos consenso GP-E6-3F (5' GGG WGG KAC TGA AAT CGG T 3') y los regresos GP-E7-5B (5' CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA 3') y PG-E7-6B (5' TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC 3'), los cuales amplifican un fragmento que va de los 602 a 666 pb. dentro de la región E6/E7. Cada reacción se preparó con las siguientes concentraciones finales: buffer gold 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 0.25 mM, GP-E6-3F 0.3 pM, GP-E7-5B 0.3 pM, PG-E7-6B 0.3

pM, Taq Polimerasa 1 U, ADN 50 ng y H₂O ultrapura para llegar un volumen final de 50 µl.

La PCR siguió el siguiente programa en el termociclador:

94°C	10 minutos	
94°C	60 segundos	} 40 ciclos
40°C	60 segundos	
72°C	120 segundos	
72°C	10 minutos	

Los productos de la PCR anterior fueron subsecuentemente amplificados con oligonucleótidos que amplifican dentro del segmento previamente amplificado, los oligonucleótidos se organizan en 4 cocteles para los siguientes tipos virales:

Coctel 1	VPH16, VPH-18, VPH-31, VPH-45, VPH-59
Coctel 2	VPH-6/11, VPH-33, VPH-52, VPH-56, VPH-58
Coctel 3	VPH-35, VPH-42, VPH-43, VPH-44
Coctel 4	VPH-39, VPH-51, VPH-66, VPH-68

Para la segunda PCR cada reacción se preparó con las siguientes concentraciones finales: buffer gold 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 0.09 mM, oligonucleótidos para cada coctel (ver tabla 4), Taq Polimerasa 1 U, 3 µl del producto de la PCR de la región E6/E7 y H₂O ultrapura para dar un volumen final de 50 µl.

La PCR siguió el siguiente programa en el termociclador:

Coctel 1 y 2:		
94°C	10 minutos	
94°C	30 segundos	} 38 ciclos
56°C	30 segundos	
72°C	45 segundos	
72°C	10 minutos	

Coctel 3:

94°C	10 minutos	
94°C	60 segundos	} 40 ciclos
40°C	60 segundos	
72°C	120 segundos	
72°C	10 minutos	

Coctel 4:

94°C	10 minutos	
94°C	30 segundos	} 38 ciclos
50°C	30 segundos	
72°C	45 segundos	
72°C	10 minutos	

El tipo viral se determinó evaluando el tamaño de los productos de la PCR múltiple anidada (ver tabla 4), los productos de la amplificación se visualizaron en un gel de agarosa 2% después de haber corrido en una cámara de electroforesis con TBE1X como buffer de corrida.

7.10. PCR de LCR en VPH-18

Se emplearon los oligonucleótidos específicos para VPH-18: LCR-A (5'ATT TCG GTT GCC TTT GGC TTA TG 3') y LCR-B (5'CGG TTG CAT AAA CTA TGT ATG C 3'), los cuales amplifican un fragmento de 363 pb. dentro de la región LCR. Para cada reacción se colocó una concentración final de buffer 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 2 mM, LCR-A 0.5 µM, LCR-B 0.5 µM, Taq polimerasa 1 U y 100 ng de ADN. Ajustando a un volumen total de 20 µl con Agua Ultrapura

La reacción se llevó a cabo en un termociclador empleando el siguiente programa:

94°C	10 minutos	
94°C	40 segundos	} 30 ciclos
59°C	40 segundos	
72°C	55 segundos	
72°C	7 minutos	

Los productos de la PCR se corrieron en un en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio en una camara de electroforesis con TBE 1X y visualizados en un transiluminador de luz UV.

7.11. PCR de E6 de VPH-18

Empleando los oligonucleótidos específicos para VPH-18: E65'-BamHI (5'GGG GGA TCC ATG GCG CGC TTT GAA GAT CCA ACA 3') y E63'-Hz30 Hind III (5'GGG AAG CTT TTA TAC TTG TGT TTC TCT GCG TCG 3'), que amplifican un fragmento de 477 pb. dentro de E6. Para cada reacción se colocó una concentración final de buffer 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 2 mM, E65'-BamHI 0.5 µM, E63'-Hz30 Hind III 0.5 µM, Taq polimerasa 1 U y 100 ng de ADN. Ajustando a un volumen total de 20 µl con Agua Ultrapura

La reacción se llevó a cabo en un termociclador empleando el siguiente programa:

94°C	10 minutos	
94°C	40 segundos	} 30 ciclos
59°C	40 segundos	
72°C	55 segundos	
72°C	7 minutos	

Los productos de la PCR se corrieron en un en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio en una camara de electroforesis con TBE 1X y visualizados en un transiluminador de luz UV.

7.12. PCR en E7 de VPH-18

Se emplearon los oligonucleótidos específicos para VPH-18: E75'-BamHI (5' GGG GGA AAG GCA ACA TTG C3') y E73'EcoRI (5'GGG GGA ATT CTT ACT GCT GGG ATG CAC ACC ACG 3'), los cuales amplifican un fragmento de 318 pb. dentro del gene E7. Para cada reacción se colocó una concentración final de buffer 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 2 mM, E75'-BamHI 0.5 µM, E73'EcoRI 0.5 µM, Taq polimerasa 1 U y 100 ng de ADN. Ajustando a un volumen total de 20 µl con Agua Ultrapura

La reacción se llevó a cabo en un termociclador empleando el siguiente programa:

94°C	10 minutos	} 30 ciclos
94°C	40 segundos	
59°C	40 segundos	
72°C	55 segundos	
72°C	7 minutos	

Los productos de la PCR se corrieron en un en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio en una cámara de electroforesis con TBE 1X y visualizados en un transiluminador de luz UV.

7.13. Microarreglo de tejidos

El microarreglo de tejidos se diseñó de la siguiente manera: se conformó por 83 muestras de las cuales tenemos: 2 muestras de carcinomas de cérvix (1 carcinoma adenoescamoso y 1 adenocarcinoma); 74 muestras de eversión glandular: 10 determinadas VPH negativas y 64 determinadas VPH positivas (37 muestras tipo VPH-18, 4 muestras tipo VPH-16, 5 tipo VPH-43, 1 muestra tipo VPH-97, 5 infecciones múltiples y 12 muestras NO tipificadas); 2 muestras de exocérvix diagnosticado colposcópica e histopatológicamente sano y 5 muestras de endocérvix de histerectomías sin signos de infección con VPH.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos específicos del tipo viral

Coctel	Genotipo	Oligo	Secuencia 5'-3'	Amplicon
Coctel 1				
	VPH-16	16F	CAT AGT TAT GCA CAG AGC TGC	457
		16R	CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	
	VPH-18	18F	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	322
		18R	GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	
	VPH-31	31F	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G	263
		31R	CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	
	VPH-45	45F	GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG	151
		45R	ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	
	VPH-59	59F	CAA AGG GGA ACT GCA AGA AAG	215
		59R	TAT AAC AGC GTA TCA GCA GC	
Coctel 2				
	VPH-6/11	6/11F	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC	334
		6/11R	TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	
	VPH-33	33F	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA	398
		33R	GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	
	VPH-52	52F	TAA GGC TGC AGT GGT TGC AG	229
		52R	CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	
	VPH-56	56F	GTG TGC AGA GTA TGT TTA TTG	181
		56R	TTT CTG TCA CAA TGC AAT TGC	
	VPH-58	58F	GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC	274
		58R	GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	
Coctel 3				
	VPH-35	35F	CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C	358
		35R	CCG ACC TGT CCA CCG TCC ACC G	
	VPH-42	42F	CCC AAA GTA GTG GTC CCA GTT A	277
		42R	GAT CTT TCG TAG TGT CGC AGT G	
	VPH-43	43F	GCA TAA TGT TCG CAC GTA GCT G	219
		43R	CAT GAA ACT GTA GAC AGG CCA AG	
	VPH-44	44F	TAA ACA GTT ATA TGT AGT GTA CCG	163
		44R	TAT CAG CAC GTC CAG AAT TGA C	
Coctel 4				
	VPH-39	39F	GAC GAC CAC TAC AGC AAA CC	280
		39R	TTA TGA AAT CTT CGT TTG CT	
	VPH-51	51F	GAG TAT GAG CGT TAT AGC AGG	223
		51R	TTT CTG TAC GTT GTC GTG TAC G	
	VPH-66	66F	TTC AGT GTA TGG GGC AAC AT	172
		66R	AAA CAT GAC CCG GTC CAT GC	
	VPH-68	68F	GCA GAA GGC AAC TAC AAC GG	333
		68R	GTT TAC TGG TCC AGC AGT GG	

El primer paso para realizar el microarreglo de tejidos fue incluir en parafina la segunda parte de cada una de las biopsias obtenidas en la clínica y que habían sido almacenadas en etanol al 70% en refrigeración a -20°C. Se les realizaron cortes histológicos de 5 µm con un micrótopo rotatorio, se montaron en una laminilla y se tiñeron con hematoxilina-eosina para al observarlas en el microscópio poder distinguir las estructuras celulares e identificar las regiones de interés. De cada una de las muestras se eligieron 3 zonas que tuviesen el tejido esperado, es decir, tejido cilíndrico y se marcaron los 3 puntos en la laminilla.

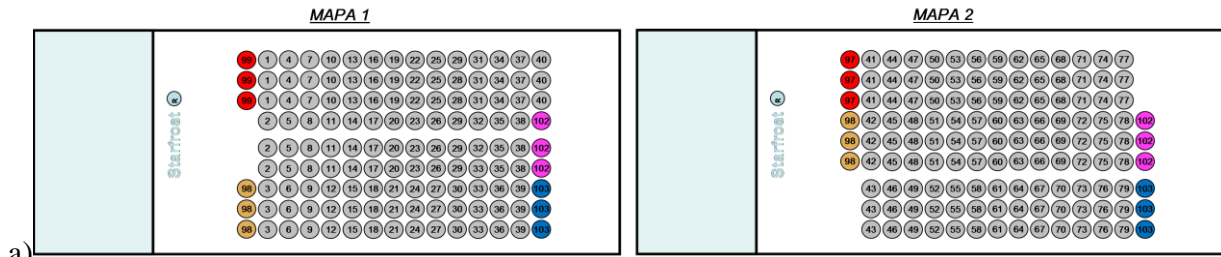
Una vez elegidas la zonas de interés, el segundo paso fue: empleando el equipo CHEMICON's Avanced Tissue Arrayer (ATA 100 Chemicon) que utiliza una aguja de un calibre de 0.5 mm perforar un bloque sin material biológico del cual se extraen cilindros de 3mm de altura y así formar una matriz en un bloque en blanco. Después, se utiliza una aguja de calibre de 4mm y se perfora en el bloque con material biológico para obtener un cilindro de la zona de interés elegida previamente, obteniendo 3 cilindros por muestra. Todos los cilindros obtenidos son colocados en orden, se incluyen en la matriz del bloque de parafina para formar un nuevo bloque. Finalmente, se realiza el corte con el micrótopo rotatorio de 4 µm y se coloca en una laminilla tratada para evitar que se despegue. Una imagen del diseño del microarreglo de tejidos y la lista de las muestras en el microarreglo se muestra en la figura 23.

7.14. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que nos permite observar la expresión de proteínas, el protocolo que se empleo es el que a continuación se detalla:

1. Deparafinar: colocar las laminillas en un horno caliente (60-65°C) por 30 minutos hasta 1 hora.
2. Hidratación:

Xilol	
Xilol	8 minutos
Xilol/Etanol (1:1)	
Etanol 100%	
Etanol 100%	
Etanol 90%	5 minutos
Etanol 70%	
H2O destilada	
3. Recuperación antigénica: se ponen las laminillas en baño María a 90°C en citrato de sodio (0.01M, pH 6), por 20 minutos y con agitación constante.
4. Lavado: se lavan las laminillas 3 veces en PBS 1X (pH 7) por 5 minutos con agitación constante.



a)

# Punto	Número de muestra	Tipo viral	# Punto	Número de muestra	Tipo viral
1	14EG	VPH -	43	200EG	VPH-18
2	38EG	VPH -	44	201EG	VPH-18
3	39EG	VPH -	45	203EG	VPH-18
4	65EG	VPH -	46	205EG	VPH-18
5	72EG	VPH -	47	206EG	VPH-18
6	85EG	VPH -	48	207EG	VPH-18
7	104EG	VPH -	49	208EG	VPH-18
8	122EG	VPH -	50	211EG	VPH-18
9	134EG	VPH -	51	212EG	VPH-18
10	204EG	VPH -	52	213EG	VPH-18
11	46EG	VPH+	53	215EG	VPH-18
12	101EG	VPH+	54	217EG	VPH-18
13	106EG	VPH+	55	219EG	VPH-18
14	172EG	VPH+	56	221EG	VPH-18
15	174EG	VPH+	57	222EG	VPH-18
16	177EG	VPH+	58	224EG	VPH-18
17	180EG	VPH+	59	225EG	VPH-18
18	182EG	VPH+	60	155EG	VPH-16
19	184EG	VPH+	61	214EG	VPH-16
20	192EG	VPH+	62	216EG	VPH-16
21	196EG	VPH+	63	218EG	VPH-16
22	202EG	VPH+	64	81EG	VPH-43
23	7EG	VPH-18	65	96EG	VPH-43
24	20EG	VPH-18	66	106EG	VPH-43
25	45EG	VPH-18	67	110EG	VPH-43
26	75EG	VPH-18	68	112EG	VPH-43
27	86EG	VPH-18	69	176EG	VPH-97
28	93EG	VPH-18	70	42EG	VPH-18/16
29	102EG	VPH-18	71	181EG	VPH-18/16
30	128EG	VPH-18	72	185EG	VPH-18/16
31	158EG	VPH-18	73	98EG	VPH-18/6/11
32	171EG	VPH-18	74	223EG	VPH-18/42
33	179EG	VPH-18	75	Histerectomia 1	
34	186EG	VPH-18	76	Histerectomia 2	
35	188EG	VPH-18	77	Histerectomia 3	
36	190EG	VPH-18	78	Histerectomia 4	
37	193EG	VPH-18	79	Histerectomia 5	
38	194EG	VPH-18			
39	195EG	VPH-18	97	CaCu 1	
40	197EG	VPH-18	98	CaCu 2	
41	198EG	VPH-18	102	Exocervix normal 1	
42	199EG	VPH-18	103	Exocervix normal 2	

b)

Figura 23. a) Diseño del microarreglo de tejidos: a la izquierda el microarreglo 1 que contiene los puntos 1 al 40 y a la derecha microarreglo 2 que contiene los puntos 41-79. En rojo y ocre:CaCu; en gris: de eversión glandular, los puntos 75-79 corresponden a histerectomías sin evidencia de infección con VPH; en fucsia y azul: exocervix “normal”. b) Relación de los puntos en el microarreglo con el número de muestra y el tipo viral.

5. Eliminación de la peroxidasa endógena: se realizan 2 lavados con una solución de metanol/H₂O₂ (27 ml/3 ml), cada lavado de 15 minutos con agitación constante.
6. Lavado: se lavan las laminillas primero con H₂O destilada por 5 minutos y después con PBS 1X (pH 7) por 5 minutos más, ambos lavados con agitación constante.
7. Bloqueo: se incuban las laminillas en una cámara húmeda a temperatura ambiente con Suero Normal de Cerdo (SNC)
8. Anticuerpo primario: se incuban las laminillas en una cámara húmeda durante toda la noche y con agitación constante, utilizando cada uno de los anticuerpos primarios. Anti-human HPV Clone KIH8 (Dako) dilución 1:750; Anti-Ki67 clone Ki-S5 (Millipore) dilución 1:250; y p-Survivin Antibody (Thr34)-R (Santa Cruz Biotechnology) dilución 1:500.
9. Lavado: lavar 5 veces en PBS 1X (pH 7), cada lavado de 8 minutos y con agitación constante.
10. Anticuerpo secundario: utilizamos Biotinilated Link Universal (Dako), se incubó en la cámara húmeda durante 30 minutos con agitación constante.
11. Complejo estreptavidina: se agrega 1 gota del complejo de Estreptavidina-HRP y se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación constante.
12. Lavado: lavar con PBS 1X (pH 7) por 5 minutos con agitación tres veces.
13. Revelado: se reveló con Diaminobencidina (DAB)(Dako) y se detuvo la reacción con H₂O.
14. Tinción con hematoxilina: se sumergieron las laminillas en hematoxilina por 5 segundos y se detuvo la tinción con H₂O.
15. Deshidratación:

H ₂ O destilada	}	5 minutos
Etanol 90%		
Etanol 100%		
Xilol/Etanol (1:1)		
Xilol		
16. Montaje: se coloca una gota del medio de montaje de resina.

La estandarización de la inmunohistoquímica contra VPH se realizó empleando cortes histológicos de 3 μm de tejido de adenocarcinoma y se observó al emplear la dilución 1:500 del anticuerpo contra L1 de VPH positividad, mientras que en el mismo adenocarcinoma al poner como control de isotipo suero normal de ratón en una dilución de 1:200, no había tinción. Para la estandarización de Ki-67 se empleó un corte de tejido con neoplasia intraepitelial cervical 1 (NIC1) y un corte de tejido gástrico, la concentración del anticuerpo empleada fue 1:250 y la concentración 1:100 de IgG de ratón como control de isotipo. Finalmente para la estandarización de suurvivina fosforilada se empleó tejido de adenocarcinoma, la concentración del anticuerpo contra p—Survivina (Thr34)-R fue de 1:500 y la concentración 1:200 de IgG de conejo como control de isotipo.

Una vez teñidos y fijados los microarreglos fueron foto-documentados y la expresión fue analizada mediante el digitalizador de imágenes Image-Pro 6.2 (Aperio). Brevemente, las laminillas fueron digitalizadas a 40X y se seleccionaron 3 regiones de 500 μm que contienen las zonas de interés, tejido glandular de cada uno de los puntos del microarreglo. Se determina cual es el color que indica la positividad y se mide la densidad por el área elegida. Los datos obtenidos del análisis densitométrico (IOD) fueron exportados a Excel para ser ordenados, se determinó el promedio de cada uno de los puntos y después de cada una de las muestras. Una vez, ordenados y obtenidos los promedios se procesaron mediante el programa estadístico Graph Pad Software, Inc.

7.15. Análisis estadístico

Empleando el programa estadístico Graph Pad Software, Inc. Se realizaron las pruebas de Fisher's para para hacer la comparación entre los grupos y la prueba de ANNOVA para la comparación de las inmunohistoquímicas. Las pruebas fueron a dos colas y una $p < 0.05$ para ser considerada como estadísticamente significativo.

8. Resultados

8.1. Población de estudio

En este estudio se incluyeron un total de 349 mujeres, las cuales basadas en su diagnóstico colposcópico y confirmadas histopatológicamente se clasificaron dentro uno de los tres grupos: Eversión Glandular, Infección con VPH y Endocérvix. Así, se obtuvieron 112 biopsias de eversión glandular, 106 biopsias de infección con VPH y 131 muestras citológicas de endocérvix. Utilizando la información obtenida del cuestionario se analizaron los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer. No encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la edad de las pacientes, en la edad promedio de la menarca, en la edad promedio del inicio de la vida sexual activa (IVSA), en el número promedio de parejas sexuales y en el número promedio de embarazos y partos. Sin embargo, al analizar la estrategia anticonceptiva empleadas podemos observar diferencias; de las mujeres pertenecientes al grupo de eversión glandular un mayor número declaró emplear el método anticonceptivo hormonal con mayor frecuencia, mientras que el método que declararon emplear menos frecuentemente fue la cirugía. Los resultados se pueden observar la tabla 5.

8.2. Determinación de la calidad del ADN extraído

El primer indicio de la calidad del ADN se obtuvo al realizar una prueba de electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, en este gel se cargaron 2 µl de cada una de las muestras y al observar los geles en el transiluminador de UV encontramos que en 111 muestras de EG el ADN se veía como una sola banda indicándonos que el ADN estaba íntegro, mientras que en una sola muestra (52 EG) se observaba un pequeño barrido lo que nos indica un poco de degradación, es decir, el 0.89% de estas muestras presenta una degradación leve. En las muestras de IVPH se observaron 105 muestras con el ADN íntegro y una muestra (34 IVPH) que mostraba un poco de degradación, el 0.94% de las muestras tiene una degradación leve. Finalmente, de las 131 muestras de

endocervix extraído con el equipo de Qiagen todas las muestras tenían una sola banda indicando que el ADN se encontraba sin degradación. En la figura 24 se muestra un gel representativo.

Para corroborar que el ADN tiene la calidad adecuada para poder ser amplificado se realizó la PCR del gene β -globina, el cual es un gene constitutivo cuyo producto proteico forma parte de la hemoglobina humana. Los productos de la amplificación observados en un gel de agarosa 1% nos mostraron que 101 de las 112 muestras de eversión glandular (90.18%) amplificaron un fragmento de 268 pb. correspondientes al tamaño esperado de la amplificación del gene β -globina. En el caso de las muestras de IVPH 98 de las 106 (92.45%) amplificaron el producto esperado y en todas las 131 muestras de endocervix se pudo observar el producto de la amplificación del gene de β -globina, en la figura 25 se muestra un gel representativo de la amplificación del gene β -globina.

Tabla 5. Factores de riesgo para la infección con VPH

	Endocervix (n=131)	Eversión Glandular (n=112)	IVPH (n=106)	valor <i>p</i> Fisher's
Edad (rango)	30.9 (17-51)	28.5 (11-45)	29.8 (16-50)	NS
Menarca	12.98	12.36	12.37	NS
IVSA	19.2	18.2	18.3	NS
# Parejas sexuales	1.3	1.89	2.2	NS
# Embarazos	2.1	1.8	1.7	NS
# Partos	2.4	1.76	1.32	NS
Método anticonceptivo				
Hormonales	9.6%	17.1%	10.2%	0.04
Cirugías	42.7%	43.1%	43.8%	NS
Barrera	15.9%	16.1%	17.3%	NS
Ritmo	4.5%	1.4%	3.0%	NS
Ninguno	27.3%	22.3%	25.7%	NS

Tabla 5. Se muestran los resultados del análisis de los factores de riesgo para la infección de VPH y el desarrollo de cáncer de cervix, se muestra una diferencia estadísticamente significativa en la edad (promedio) y los métodos anticonceptivos. NS: no significativo.



Figura 24. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Se muestran los productos de la extracción de ADN de la muestras 169EG a 184EG.

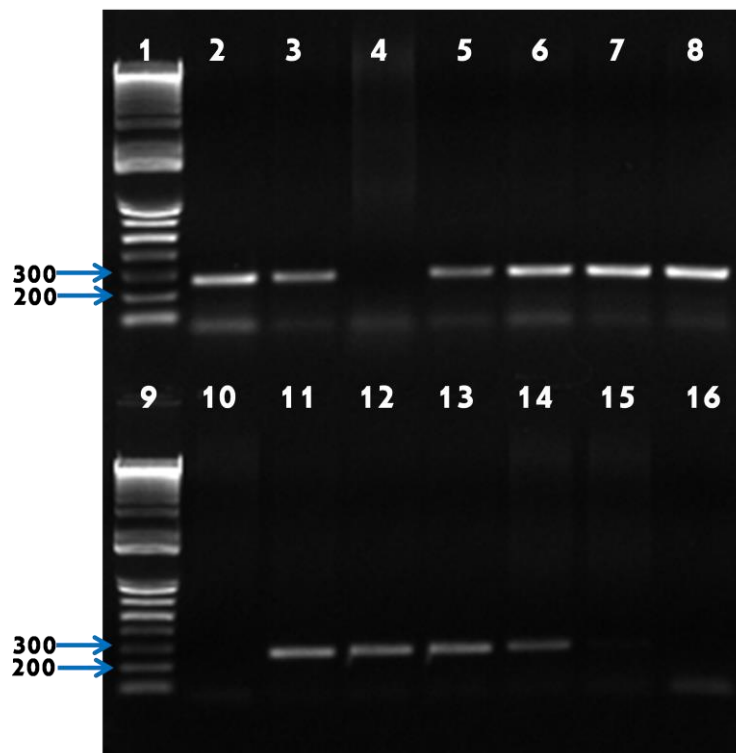


Figura 25. Amplificación del gene β -globina en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Se muestra la amplifacación del fragmento de ~ 260 pb. Carriles 1 y 9: Marcador de peso molecular; carril 2: SiHa; carril 3: 172EG, carril 4: 173EG; carril 5 174EG; carril 6 175EG; carril 7: 176EG; carril 8: 177EG; carril10: 178EG; carril 11: 179EG; carril 12: 180EG; carril 13: 181EG; carril 14: 182EG; carril 15: 183EG; y carril 16: H₂O como control negativo.

8.3. Determinación de la positividad a VPH

8.3.1. PCR con los oligonucleótidos universales MY9/MY11

La PCR con los oligonucleótidos universales MY09 y MY11, amplifican un fragmento de aproximadamente 450 pb. dentro del gene L1 del genoma del VPH. Al analizar los productos de la amplificación en un gel de agarosa al 1% encontramos que 54 de las 101 muestras de eversión glandular (53.46%) tenían el fragmento esperado de ~450 pb.; 71 de las 98 muestras de IVPH (72.44%); y 43 de las 131 muestras de endocérnix (32.82%) fueron positivas para VPH empleando los oligonucleótidos previamente mencionados. Un gel representativo de la amplificación con MY09 y MY11 se puede observar en la figura 26 y los resultados se muestran en la tabla 6.

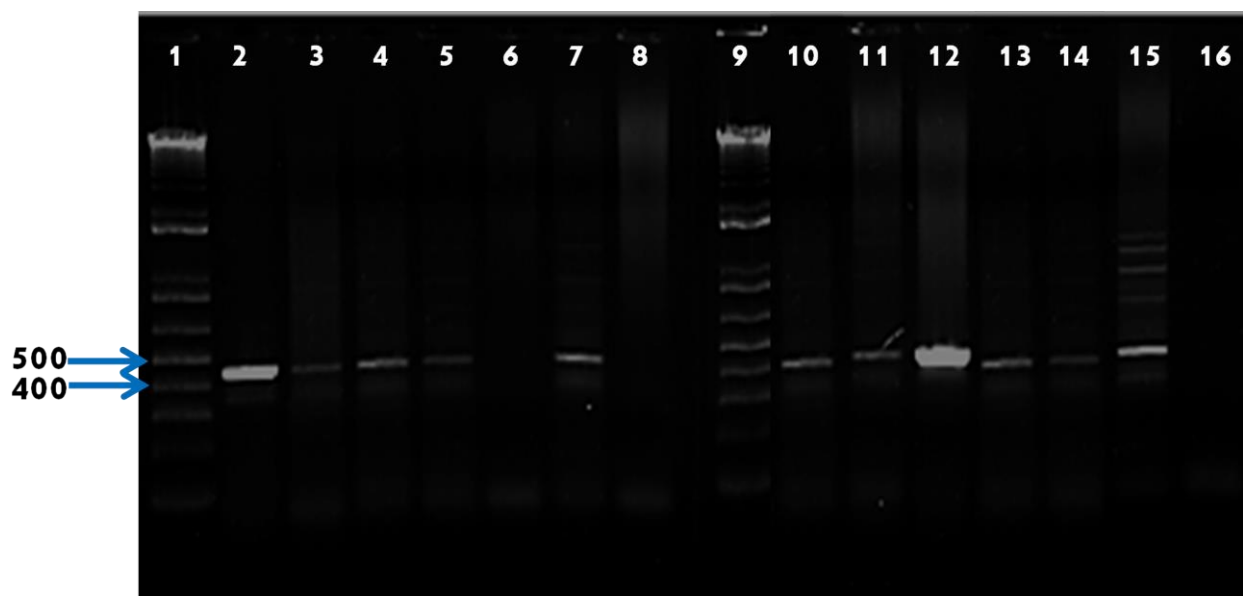


Figura 26. PCR con los oligonucleótidos universales MY09 y MY11. Se muestra un gel representativo de la amplificación empleando los oligonucleótidos universales MY09 y MY11, cuyo fragmento es de ~450 pb. En los carriles 1 y 9: Marcador de peso molecular; carril 2: SiHa (control positivo); carril 3: 199EG; carril 4: 200EG; carril 5: 201EG; carril 6: 202EG; carril 7: 203EG; carril 8: 204EG; carril 10: 205EG; carril 11: 206EG; carril 12: 207EG; carril 13: 208EG; carril 14: 209EG; carril 15: 210EG; y carril 16 H₂O (control negativo).

8.3.2. PCR con los oligonucleótidos universales LC1/LC2

Otro juego de oligonucleótidos universales para la detección del VPH por medio de PCR son: LC1 y LC2 los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 250 pb. dentro del gene L1. Se analizaron todas las muestras

que fueron negativas a la PCR MY09/MY11: 47 de Eversión Glandular, 28 de IVPH y 88 de endocérnix. La visualización en el gel de agarosa 1% nos permitió ver que 37 (36.63%), 19 (19.39%) y 4 (3.05%) respectivamente, amplificaron con estos oligonucleótidos. Un gel representativo de esta PCR se muestra en la figura 27.

Al analizar los resultados de la amplificación utilizando los oligonucleótidos universales MY09/MY11 y L1C1/L1C2 encontramos que las muestras de eversión glandular amplificaron 54 (53.46%) con MY09/MY11 y 37 (36.63%) con L1C1/L1C2, dando un total de 91 (90.1%) muestras determinadas como positivas a VPH. En las muestras de infección con VPH 71 (72.44%) amplificaron con MY09/MY11 y 19 (19.39%) amplificaron con L1C1/L1C2, para dar un total de 90 (91.84%) muestras positivas a VPH. Mientras que, en las muestras de endocérnix 43 (32.82%) amplificaron con MY09/MY11 y 4 (3.05%) amplificaron con L1C1/L1C2, para formar un total de 47 (35.88%) muestras positivas a VPH. Estos resultados se pueden ver en la tabla 6.

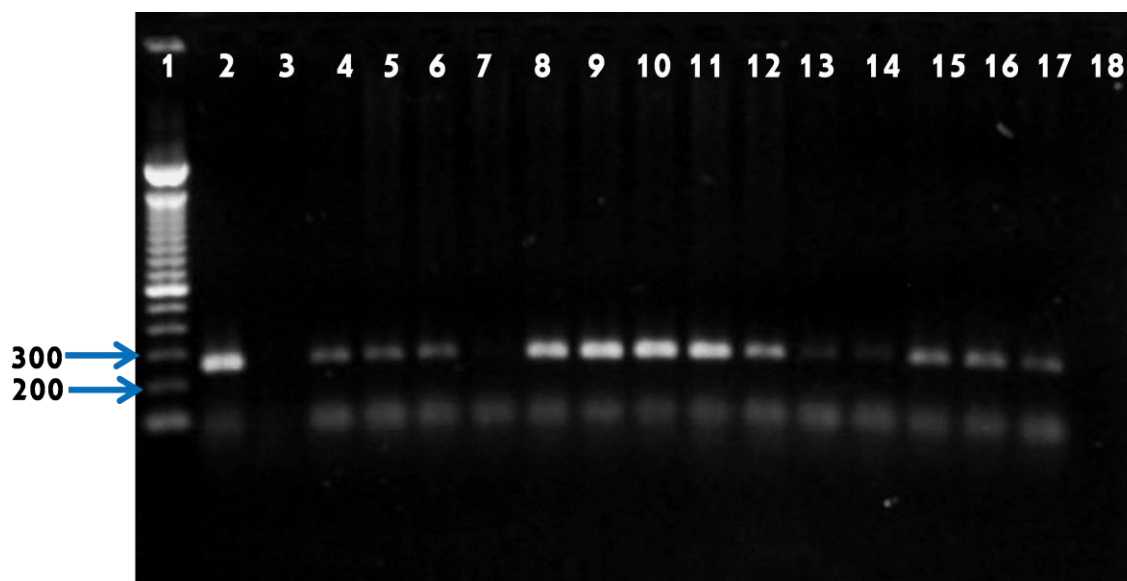


Figura 27. PCR con los oligonucleótidos L1C1 y L1C2. Se muestra un gel representativo de la amplificación empleando los oligonucleótidos universales L1C1/L1C2, cuyo fragmento es de ~250 pb. En los carriles 1: Marcador de peso molecular; carril 2: SiHa (control positivo); carril 3: 122EG; carril 4: 123EG; carril 5:127EG; carril 6:128EG; carril 7:134EG; carril 8:132EG; carril 135EG; carril 11: 171EG; carril 12: 172EG; carril 13:174EG; carril 14:175EG; carril 15:176EG; y carril 16 H₂O (control negativo).

Tabla 6. Detección de VPH

	MY09/MY11	L1C1/L1C2	VPH
	Positivas	Positivas	Positivas
Endocérnix	43	4	47
(n= 131)	(32.82%)	(3.05%)	(35.88%)
Eversión Glandular	54	37	91
(n= 101)	(53.46%)	(36.63%)	(90.1%)
IVPH	71	19	90
(n= 98)	(72.44%)	(19.39%)	(91.84%)

Tabla 6. Detección de ADN de VPH. Muestra los resultados de la PCR con los oligonucleótidos universales MY09/MY11 y L1C1/L1C2.

8.4. Determinación del tipo viral

8.4.1. PCR con PR3/PR4

El primer paso para la determinación del tipo viral de las muestras positivas al ADN viral fueron PCR específicas para los tipos virales más frecuentes en el cérvix y que están relacionados con el desarrollo del cáncer cervical: el VPH-16 y VPH-18.

A las muestras de Eversión Glandular e IVPH determinadas previamente como positivas a VPH se les realizó una PCR con los oligonucleótidos PR3/PR4 específicos para el VPH-16, estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 499 pb en los genes E1, E6 y E7 de HPV-16. El número de muestras positivas fue de 6 (6.59%) en el caso de las eversiones glandulares y de 52 (58.43%) en el caso de las infecciones con VPH. Un gel representativo del producto de la amplificación se puede ver en la figura 28, como control positivo se empleó ADN extraído de la línea celular SiHa y como control negativo H₂O para determinar que no hay contaminación en la reacción.

8.4.2. PCR con VPH18F/HPV18R

El siguiente paso para la tipificación de las muestras de eversión glandular y de infección con VPH que se habían determinado previamente como positivas a VPH fue la amplificación con los oligonucleótidos específicos para VPH-18, los

cuales amplifican dentro del gene E7 un fragmento de 100 pb. Al observar los productos de la amplificación encontramos que 22 (24.17%) de las 91 muestras positivas a VPH del grupo de eversión glandular amplificaron este fragmento; al ver la amplificación de las 90 muestras del grupo de infección con VPH que fueron determinadas como positivas a VPH encontramos que 25 (27.78%) amplificaron el fragmento esperado de 100 pb. indicándonos que son positivas a VPH-18, un gel representativo de la amplificación de VPH-16 utilizando los oligonucleótidos específicos HVP18F/HPV18R se muestra en la figura 29.

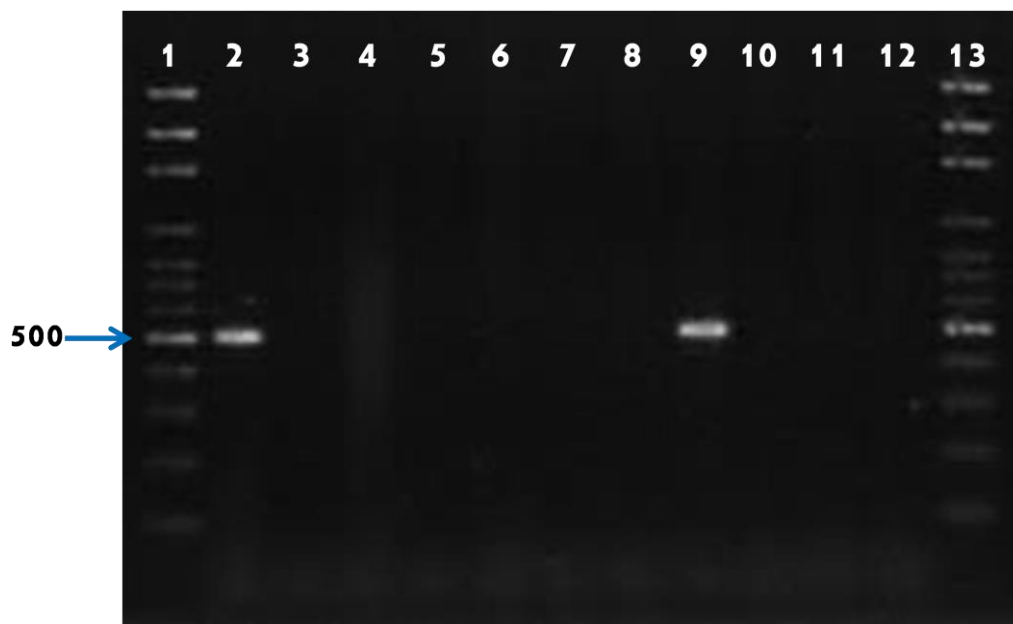


Figura 28. PCR con los oligonucleótidos específicos para VPH-16 (PR3/PR4). Se muestra un gel representativo de la amplificación con oligonucleótidos específicos PR3/PR4 que amplifican un producto dentro de E7, E6 y E1 de 499 pb. En el carril 1 y 13: marcador de peso molecular; carril 2: SiHa (control positivo); carril 3 172EG; carril 4: 174EG; carril 5: 175EG; carril 6: 176EG; carril 7: 177EG; carril 8: 179; carril 9: 181EG; carril 10: 182EG; carril 11: 184EG; carril 12: H₂O (control negativo).

Los resultados de las PCR's utilizando los dos juegos de oligonucleótidos PR3/PR4 y HPV18F/HPV18R específicos para VPH-16 y VPH-18 respectivamente, nos muestran que de las 91 muestras de eversión glandular analizadas 6 (6.59%) amplificaron con PR3/PR4 y 22 (24.17%) amplificaron con HPV18F/HPV18R. Mientras que de las 90 muestras analizadas de infección con VPH determinadas previamente como positivas a VPH tenemos que: 52 (57.78%) fueron positivas para VPH-16 dado que amplificaron con PR3/PR4 y 25 (27.78%) fueron positivas a VPH-18 dado que amplificaron con HPV18F/HPV18R. Al analizar los resultados podemos ver que el número total de muestras tipificadas por medio de PCR's específicas

fue de 24 (26.37%) para las eversions glandulares, de las cuales 2 (2.19%) son VPH-16, 18 (19.78%) son VPH-18 y 4 (4.39%) son VPH-16/VPH-18 dado que amplificaron con ambos juegos de oligonucleótidos. Mientras que, de las muestras de infección con VPH se tipificaron un total de 57 (63.33%), de las cuales: 32 (35.56%) son VPH-16, 5 (5.56%) son VPH-18 y 20 (22.22%) son VPH-16/VPH-18. Estos resultados se pueden ver claramente en la tabla 7.

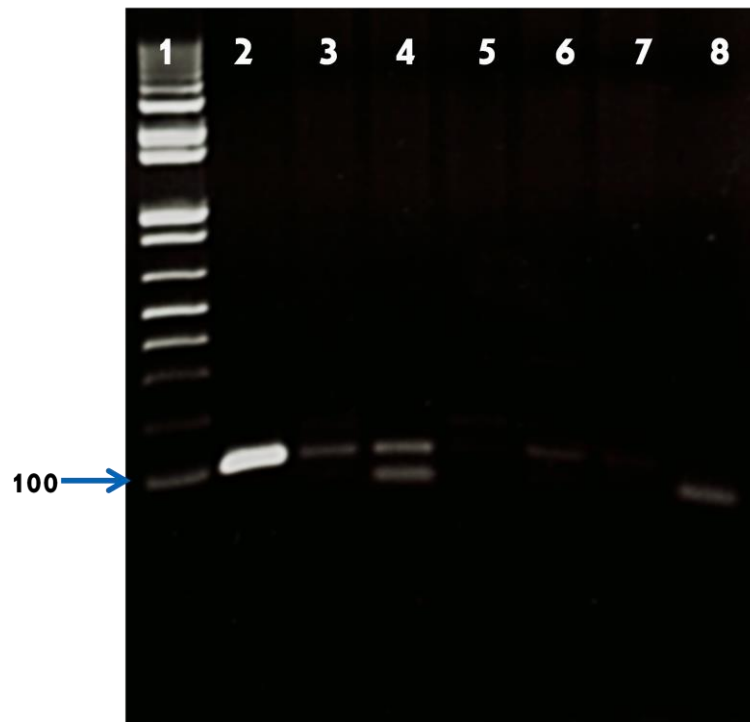


Figura 29. PCR con los oligonucleótidos específicos para VPH-18 (HVP18F/HPV18R). Se muestra un gel representativo de la amplificación con oligonucleótidos específicos VPH18F/VPH18R que amplifican un producto dentro de E/ de 100 pb. En el carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: HeLa (control positivo); carril 3: 203EG; carril 4: 205EG; carril 5: 206EG; carril 6: 207EG; carril 7: 208EG; y carril 8: H₂O(control negativo).

Tabla 7. Tipificación de VPH por PCR

	HPV-16	HPV-18	VPH-16/VPH-18
	Positivas	Positivas	Positivas
Eversión Glandular	2	18	4
(n= 91)	(2.19%)	(19.78%)	(4.39%)
IVPH	32	5	20
(n= 90)	(35.56%)	(5.56%)	(22.22%)

Tabla 7. Determinación del tipo viral por PCR específicas para VPH-16 y VPH-18. Se muestran de manera explícita los resultados de la amplificación con los oligonucleótidos específicos PR3/PR4 y VPH18F/HPV18R para VPH-16 y VPH-18 respectivamente.

8.4.3. Secuenciación

Se realizó la secuenciación de todas aquellas muestras que hasta este momento no habían podido ser tipificadas por medio de PCR's con oligonucleótidos específicos para los tipos virales VPH-16 y VPH-18. Así, se sometieron a secuenciación 67 muestras de eversión glandular, 33 muestras de infección con VPH y las 47 muestras de endocérvix, los resultados de la comparación de la secuenciación empleando BLAST fueron los siguientes: se determinó el tipo viral de 49 (53.85%) muestras de eversión glandular: 45 (49.45%) de las muestras fueron determinadas como VPH-18, 3 (3.29%) de las muestras fueron determinadas como VPH-16 y 1 (1.1%) fue determinada como VPH-97. En el caso de las muestras de infección con VPH se determinó el tipo viral en 17 (18.89%) de ellas: 13 (14.44%) resultaron ser VPH-18; 2 (2.22%) fueron VPH-51; 1 (1.11%) muestra del VPH66; y 1 muestra del VPH11. En 45 (95.74%) de las muestras de endocérvix logramos determinar el tipo viral: 31 (65.96%) fueron determinadas como VPH-18; 2 (4.25%) de cada uno de los tipos virales VPH31, VPH56 y VPH66; y 1 (2.13%) muestra de cada uno de los tipos VPH16, VPH51, VPH53, VPH58, VPH90, VPH97, SDL10 y MM8. Estos resultados se muestran en la tabla 8.

Al unir los resultados de las 2 metodologías empleadas para la tipificación: PCR's específicas para los tipos VPH-16 y VPH-18 y la secuenciación, podemos ver que el número total de muestras tipificadas es de 73 para el grupo de eversión glandular, 75 para el grupo de infección con VPH y 45 para el grupo de endocérvix. En las muestras de eversión glandular determinamos la presencia de virus de alto riesgo en 72 (79.12%) muestras: 5 (5.49%) del tipo VPH-16, 63 (69.23%) del tipo VPH-18 y 4 (4.39%) presentaron una co-infección con los tipos VPH-16/VPH-18; y se determinó una muestra con el tipo VPH-97. Mientras que en 68 (75.5%) de las muestras de infección con VPH se determinó la presencia de virus de alto riesgo: 32 (35.5%) corresponden al VPH-16, 18 (20%) son VPH-18, 2 (2.22%) son VPH-51, 1 (1.11%) es tipo VPH-66 y se determinaron 20 (22.22%) muestras con una co-infección con los tipos virales VPH-16/VPH-18; y se determinó 1 (1.11%) muestra como de bajo riesgo perteneciente al tipo VPH-11. Las muestras de endocérvix no modificaron sus números, dado a que estas muestras sólo fueron

tipificadas empleando la técnica de secuenciación, pero vamos a recordar los datos obtenidos. Se determinó que 41 (87.23%) muestras pertenecen al grupo de virus de alto riesgo: 1 (2.13%) es VPH-16, 31 (65.96%) son VPH-18, 2 (4.25%) son VPH-31, 1 (2.13%) es VPH-51, 1 (2.13%) es VPH-53, 2 (4.25%) son VPH-56, 1 (2.13%) es VPH-58 y 1 (2.13%) es VPH-66; 4 (8.51%) se determinaron como de riesgo NO determinado: 1 (2.15%) de cada uno de los tipos virales VPH-90, VPH-97, VPH-SDL10 y

Tabla 8. Secuenciación

Tipo Viral	Endocérvix (n=47)	Eversión Glandular (n=91)	IVPH (n=90)
VPH-11	0	0	1 (1.11%)
VPH-16	1 (2.13%)	3 (3.29%)	0
VPH-18	31 (65.96%)	45 (49.45%)	13 (14.44%)
VPH-31	2 (4.25%)	0	0
VPH-51	1 (2.13%)	0	2 (2.22%)
VPH-53	1 (2.13%)	0	0
VPH-56	2 (4.25%)	0	0
VPH-58	1 (2.13%)	0	0
VPH-66	2 (4.25%)	0	1 (1.11%)
VPH-90	1 (2.13%)	0	0
VPH-97	1 (2.13%)	1 (1.1%)	0
SDL10	1 (2.13%)	0	0
MM8	1 (2.13%)	0	0
TOTAL	45 (95.74%)	49 (53.85%)	17 (18.89%)

Tabla 8. Resultados de la secuenciación y comparación empleando BLAST.

Tabla 9. Determinación del tipo viral

	Endocérvix	Eversión Glandular	IVPH
Tipo Viral	(n=47)	(n=91)	(n=90)
Alto Riesgo			
VPH-16	1 (2.13%)	5 (5.49%)	32 (35.5%)
VPH-18	31 (65.96%)	63 (69.23%)	18 (20%)
VPH-16/18	0	4 (4.39%)	20 (22.22%)
VPH-31	2 (4.25%)	0	0
VPH-51	1 (2.13%)	0	2 (2.22%)
VPH-53	1 (2.13%)	0	0
VPH-56	2 (4.25%)	0	0
VPH-58	1 (2.13%)	0	0
VPH-66	2 (4.25%)	0	1 (1.11%)
Total parcial Alto Riesgo	41 (87.23%)	72 (79.12%)	73 (81.11%)
Riesgo NO determinado			
VPH-90	1 (2.13%)	0	0
VPH-97	1 (2.13%)	1 (1.1%)	0
SDL10	1 (2.13%)	0	0
MM8	1 (2.13%)	0	0
Total parcial Riesgo NO determinado	4 (8.51%)	1 (1.1%)	0
Bajo riesgo			
VPH-11	0	0	1 (1.11%)
Total parcial Bajo riesgo	0	0	1 (1.11%)
TOTAL	45 (95.74%)	73 (80.22%)	75 (83.33%)

Tabla 9. Determinación del tipo viral. Se muestra la suma de los resultados obtenidos por PCR específica para VPH-16 y VPH-18, unido a los resultados obtenidos de la secuenciación.

8.5. Determinación de co-infecciones virales: PCR múltiple anidada

Cuando se realizó la tipificación con oligonucleótidos específico para VPH-16 y VPH-18 observamos que 20 muestras estaban co-infectadas con los tipos virales 16 y 18, así, que deseamos saber si podían haber otras co-infecciones y para determinar estas co-infecciones empleamos la técnica de PCR múltiple anidada. Esta técnica se basa en el uso de oligonucleótidos específicos de los tipos virales, los cuales amplifican dentro de un fragmento que ha sido amplificado previamente. La primera PCR se da dentro de la región de E6/E7 y el producto de 602- 666 pb. es empleado como templado para la segunda PCR. Para la segunda PCR se emplean los oligonucleótidos específicos del tipo viral y se organizan en 4 cocteles: Coctel 1 (VPH16, 18, 31, 45, 59), Coctel 2 (VPH-6/11, 33, 52, 56, 58), Coctel 3 (VPH-35, 42, 43, 44) y Coctel 4 (VPH-39, 51, 66, 68), y la identificación de cada tipo viral fue lograda al evaluar el tamaño de los productos, en la tabla 4 se pueden ver el tamaño de los productos esperados para cada uno de los tipos virales.

Así, 19 de las 85 muestras de eversión glandular analizadas amplificaron el producto esperado para uno más de los tipos virales: 15 muestras amplificaron un solo producto (6 muestras fueron VPH-43, 2 muestras fueron VPH-6/11, 2 muestras fueron VPH-42, 2 muestras fueron VPH-66, 1 muestra fue VPH-16, 1 muestra fue VPH-52 y 1 muestra fue VPH-56), 4 muestras amplificaron para 2 tipos virales (1 muestra amplifico para VPH-18 y VPH-51, 1 muestra amplifico para VPH-43 y VPH-51, 1 muestra amplifico para VPH-43 y VPH-66 y 1 muestra amplifico para VPH-52 y VPH-66). Estos resultados los podemos ver en la tabla 10 y geles representativos de cada coctel se pueden ver en la figura 30. Como controles positivos empleamos: ADN extraído de las líneas celulares CaSki y HeLa que contienen ADN de los tipos virales VPH-16 y VPH-18, respectivamente, también empleamos como controles positivos ADN previamente extraído y tipificado como: VPH-31, VPH-45, VPH-59 (Coctel 1), VPH-6/11, VPH-33, VPH-52, VPH-56, VPH-58 (Coctel 2), VPH-35, VPH-42, VPH-43, VPH-44 (Coctel 3), VPH-39, VPH-51, VPH-66 y VPH-68 (Coctel 4). Como controles negativos empleamos ADN de tejido humano previamente

determinado como negativo a VPH para determinar que no se amplifica con esta PCR alguna otra región en el ADN humano, también se hizo una reacción sin ADN y en su lugar se puso un poco más de agua ultrapura, esto para descartar la posibilidad de contaminación de los reactivos usados en la PCR.

Los resultados obtenidos con las tres distintas metodologías: tipificación por medio de PCR's específicas, tipificación por secuenciación y determinación por PCR múltiple anidada son mostrados en la tabla 11. Aquí podemos ver 62 (68.13%), es decir, la mayoría de las muestras tienen infecciones sencillas: 52 (57.14%) son HPV-18, 5 (5.49%) son VPH-43, 4 (4.39%) son VPH-16 y 1 (1.1%) es VPH-97. Se determinaron 14(15.38%) muestras como infecciones dobles de las cuales: 4 (4.39%) fueron VPH-18/16, 2 (2.2%) fueron VPH-18/42, 2 (2.2%) VPH-18/66 y 1 (1.1%) de los tipos VPH-18/43, VPH-18/51, VPH-18/52, VPH-18/56 y VPH-43-51. Y finalmente, se determinaron 3 (3.3%) como infecciones triples: 1 (1.1%) determinada como VPH-18/16/6/11, 1 (1.1%) determinada como VPH-18/43/66 y 1 (1.1%) más determinada como VPH-18/52/66. Dando así un total de 79 (86.81%) de muestras que pudieron ser tipificadas, quedando 12 (13.19%) de muestras que son positivas a VPH pero cuyo tipo viral NO pudo ser determinado.

Tabla 10. PCR múltiple anidada

	Número de muestras
Simples	15
VPH-6/11	2
VPH-16	1
VPH-42	2
VPH-43	6
VPH-52	1
VPH-56	1
VPH-66	2
Dobles	4
VPH-18/51	1
VPH-43/51	1
VPH-43/66	1
VPH-52/66	1
Total	19

Tabla 10. PCR múltiple anidada. En esta tabla muestran los resultados de la amplificación con los oligonucleótidos específicos para cada uno de los tipos virales aquí enlistados

Tabla 11. Tipo de infección en las muestras de Eversión Glandular

Tipo de infección	Eversión Glandular (n=91)
Sencilla	
VPH-16	4 (4.39%)
VPH-18	52 (57.14%)
VPH-43	5 (5.49%)
VPH-97	1 (1.1%)
Parcial	62
Sencilla	(68.13%)
Doble	
VPH-18/6/11	1 (1.1%)
VPH-18/16	4 (4.39%)
VPH-18/42	2 (2.2%)
VPH-18/43	1 (1.1%)
VPH-18/51	1 (1.1%)
VPH-18/52	1 (1.1%)
VPH-18/56	1 (1.1%)
VPH-18/66	2 (2.2%)
VPH-43/51	1 (1.1%)
Parcial	14
Doble	(15.38%)
Triple	
VPH-18/16/6/11	1 (1.1%)
VPH-18/43/66	1 (1.1%)
VPH-18/52/66	1 (1.1%)
Parcial	3
Triple	(3.3%)
Total	79
	(86.81%)

Tabla 11. Tipo de infección determinada en las muestras de Eversión Glandular al unir los resultados de las técnicas de: PCR's específicas para VPH-16/18, secuenciación y PCR múltiple anidada.

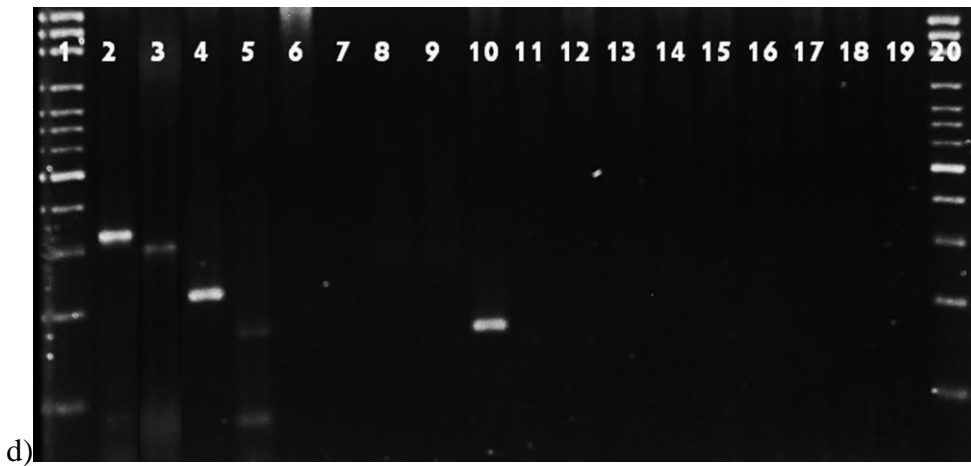
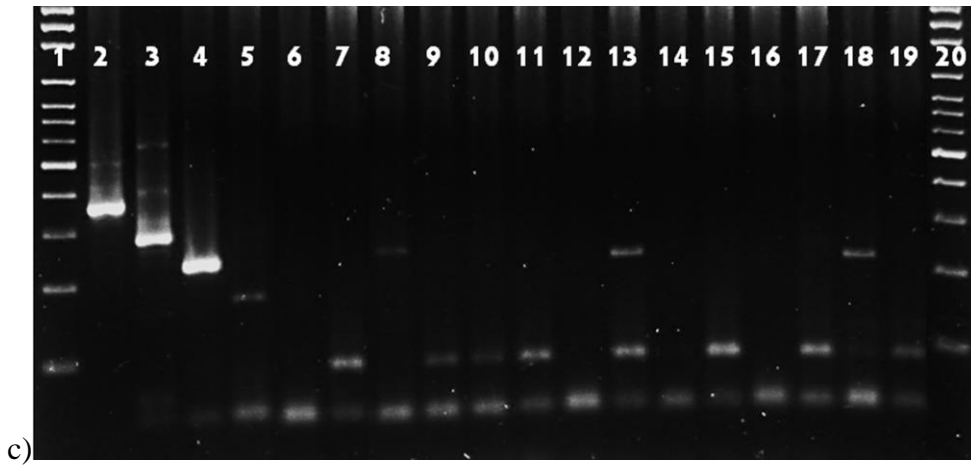
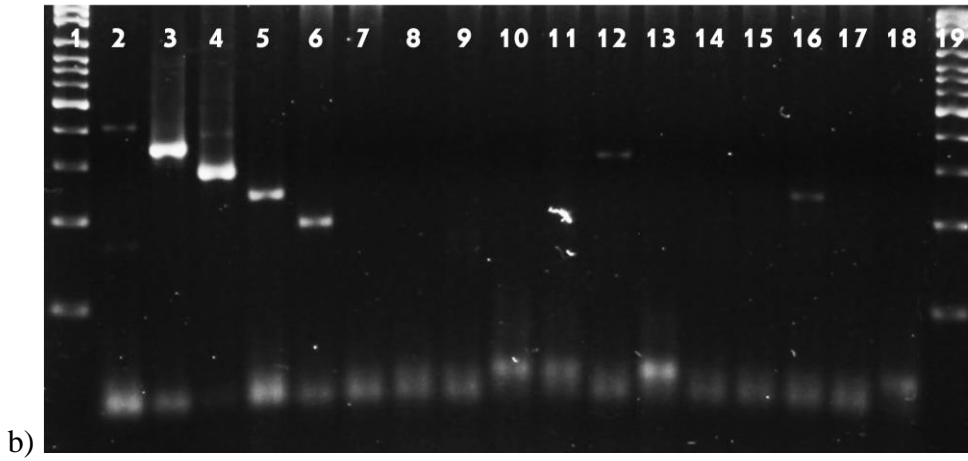
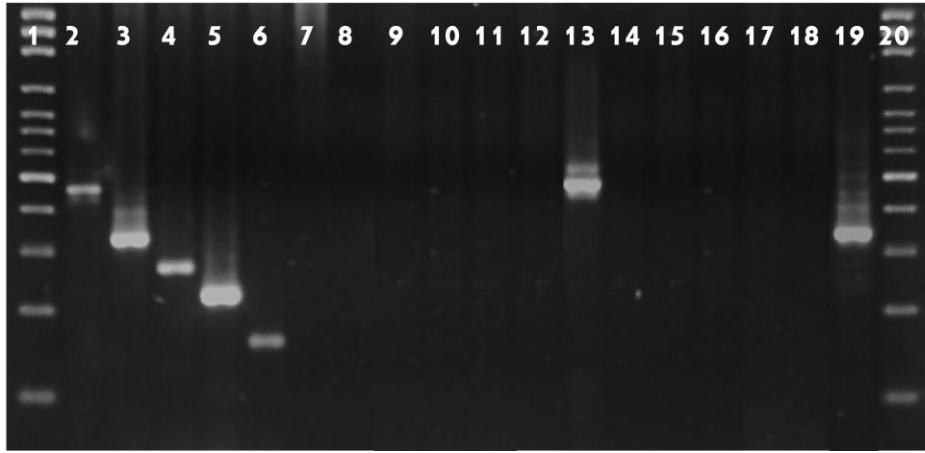


Figura 30. Geles representativos de los cocteles 1- 4 de la PCR múltiplex anidada. a) **Coctel 1**: carriles 1 y 20: marcador de peso molecular; carril 2: CaSki; carril3: HeLa; carril 4: VPH-31; carril5: VPH-59; carril 6: VPH-45; carril 7: N1; carril 8: N2; carril 9:9EG; carril10; 20EG; carril 11: 26EG; carril12: 35EG; carril 13: 42EG; carril 14: 46EG; carril 15: 47EG; carril 16: 48EG; carril 17: 58EG; carril 18: 59EG; carril 19 73EG. b) **Coctel 2**: carriles 1 y 19: marcador de peso molecular; carril 2: VPH-33; carril3: VPH-6/11; carril 4: VPH-58; carril5: VPH-52; carril 6: VPH-56; carril 7: N1; carril 8: N2; carril 9: 155EG; carril 10:157EG; carril 11: 159EG; carril12: 168EG; carril 13:171EG; carril 14: 172EG; carril 15: 174EG; carril 16: 175EG; carril 17: 177EG; carril 18: 179EG. c) **Coctel 3**: carriles 1 y 20: marcador de peso molecular; carril 2: VPH-35; carril3: VPH-42; carril 4: VPH-43; carril5: VPH-44; carril 6: N2; carril 7: N1; carril 8: 81EG; carril 9: 86EG; carril10: 90EG; carril 11: 93EG; carril12: 95EG; carril 13: 96EG; carril 14: 98EG; carril 15: 100EG; carril 16: 101EG; carril 17: 102EG; carril 18: 105EG; carril 19: 106. d) **Coctel 4**: carriles 1 y 20: marcador de peso molecular; carril 2: VPH-68; carril3: VPH-39; carril 4: VPH-51; carril5: VPH-66; carril 6: N1; carril 7: N2; carril 8: 81EG; carril 9: 86EG; carril10: 90EG; carril 11: 93EG; carril12: 95EG; carril 13: 96EG; carril 14: 98EG; carril 15: 100EG; carril 16: 101EG; carril 17: 102EG; carril 18: 105EG; carril 19: 106.; N1 (control negativo 1): reacción con ADN previamente determinado como negativo para VPH; N2 (control negativo 2): reacción sin ADN.

8.7. Corroboración del tipo viral VPH-18 en eversiones glandulares

Para corroborar que las muestras determinadas como VPH-18 efectivamente lo eran realizamos PCR específicas. La primera de estas PCR's amplifica dentro de la región grande de control (LCR). Se analizaron 46 muestras de eversión glandular tipificadas previamente como VPH-18. Los resultados de esta amplificación se observan en la tabla 12, donde se muestra que únicamente 2 (4.35%) muestras amplificaron el producto esperado de 363 pb.

Debido a estos resultados realizamos una segunda PCR específica para VPH-18, pero ahora la región por amplificar se encuentra dentro del gene de E6. Al analizar los productos de la amplificación encontramos que las mismas 2 (4.35%) muestras amplificaron el producto esperado de 477 pb.

La última PCR específica empleada para corroborar que las muestras tipificadas como VPH-18 lo eran fue aquella que amplifica dentro del gene de E7. Cuando analizamos los productos de esta amplificación observamos que de las 46 muestras analizadas 44 (95.65%) amplificaron el producto esperado de 318 pb.

El gel representativo de cada una de las tres PCR's empleadas se muestra en la figura 31 y en la tabla 12 se presentan los resultados.

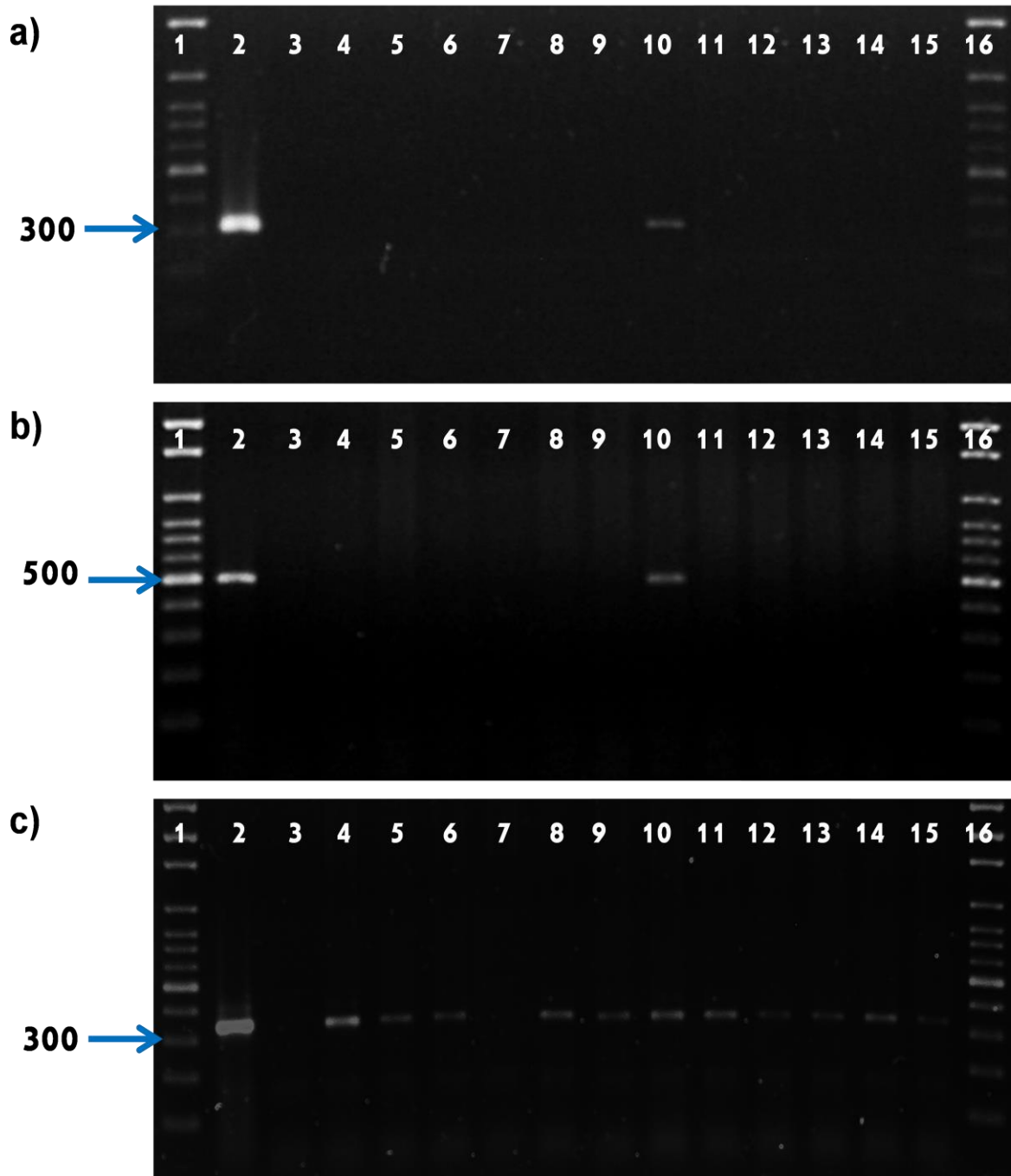


Figura 31. Corroboración del VPH-18 en eversions glandulares del cérvix. Geles representativos de cada una de las PCRs empleadas para corroborar el tipo viral VPH-18: a) PCR de la región LCR; b) PCR del gene E6; c) PCR del gene E7. Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular; carril 2: HeLa; carril 3: H₂O; carril 4: 205EG; carril 5: 206EG; carril 6: 208EG; carril 7: 210 EG; carril 8: 212 EG; carril 9: 213EG; carril 10: 215EG; carril 11: 217EG; carril 12: 219EG; carril 13: 221EG; carril 14: 222EG; carril 15: 223EG. Como control positivo se utilizó ADN de la línea celular HeLa y como control negativo se reemplazó el ADN por H₂O.

Tabla 12. Corroboración del VPH-18 en eversions glandulares

	Eversión Glandular (n=46)
LCR	2 (4.35%)
E6	2 (4.35%)
E7	44 (95.65%)
Total	44 (95.65%)

Tabla 12. Corroboración de VPH-18 en eversions glandulares. Muestra los resultados de las tres PCR's específicas para VPH-18, cada una en una región distinta: LCR, E6 y E7.

8.8. Microarreglo de tejidos

8.8.1. Localización y determinación de la presencia de VPH en muestras de eversión glandular

Para contestar la pregunta: ¿Es la célula cilíndrica del epitelio endocervical evertido infectada por el VPH? Existen varias estrategias para responder a esta pregunta, sin embargo, la forma en que abordarnos esta pregunta para tener una posible respuesta fue a través de la inmunohistoquímica de las eversions glandulares contra la proteína mayoritaria de la cápside, L1 de HVP.

Para corroborar la especificidad del anticuerpo contra L1 de VPH se emplearon como control positivo un tejido con neoplasia intraepitelial cervical 1 (NIC1) y como control negativo tejido de pulmón, al observar al microscopio podemos ver que en la NIC 1 había una tinción en el citoplasma de las células de los estratos superiores, mientras que, no se observó positividad en el tejido pulmonar (Figura 32). La inmunohistoquímica se realizó empleando la concentración de 1:500, esta misma concentración se empleó para hacer la inmunohistoquímica de los microarreglos de tejidos.

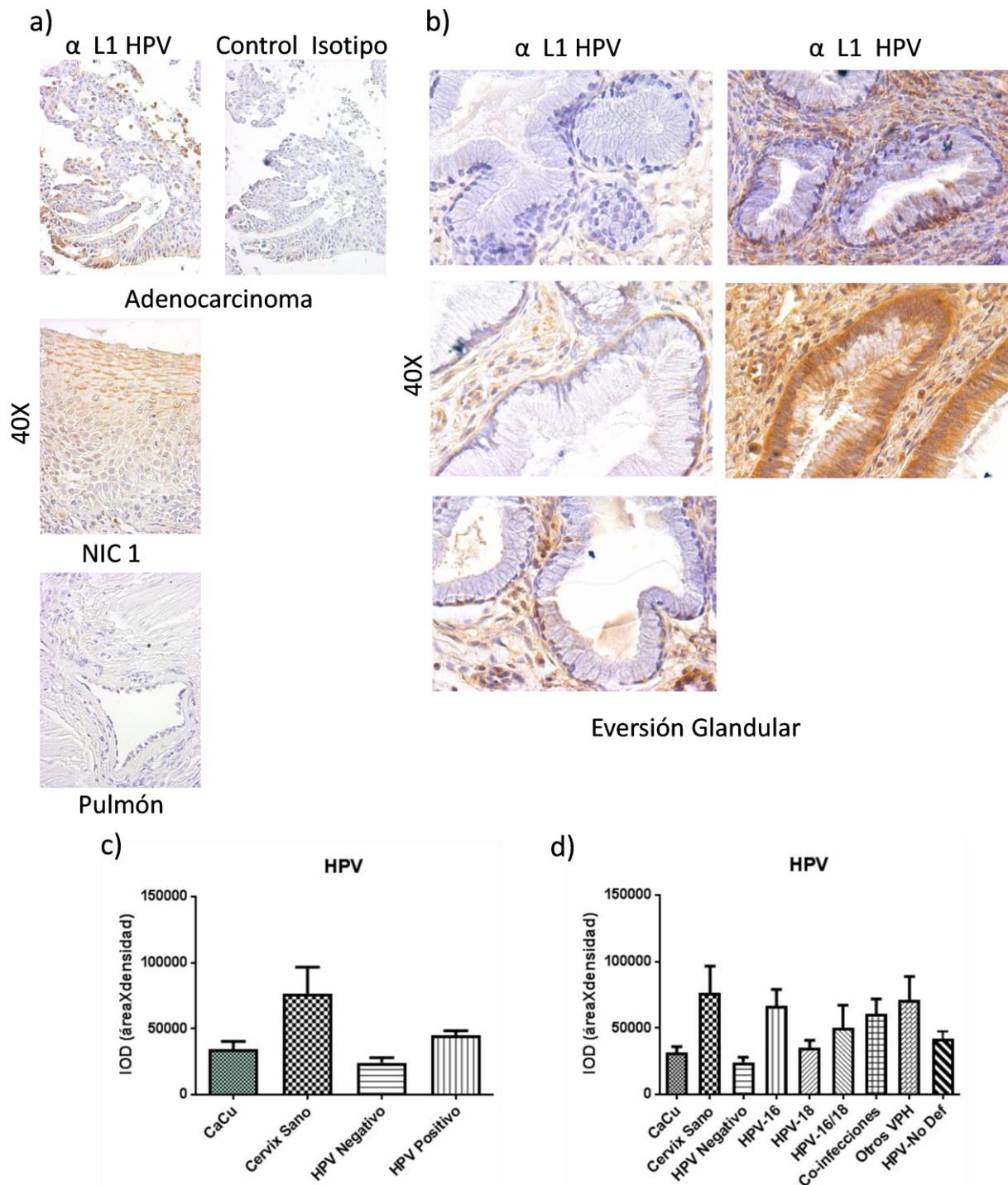


Figura 32. Inmunohistoquímica contra la proteína mayoritaria de la cápside, L1 de VPH.
a) Estandarización. Tejido de adenocarcinoma de cervix fue empleado para la estandarización del anticuerpo contra L1 de VPH (1:500) e IgG de ratón (1:200) como control de isotipo. Inmunohistoquímica contra L1 de VPH (1:500) en tejido de NIC 1 como control positivo y en tejido de pulmón como control negativo. b) Se muestran distintos niveles de expresión de L1 de VPH en las muestras de eversión glandular del en el microarreglo de tejidos, en un aumento de 40X. c y d) Análisis densitométricos de la expresión de L1 de VPH. Los datos obtenidos de la cuantificación de la densidad x área se clasificaron en 4 categorías: CaCu, muestras de eversión glandular VPH negativas, VPH positivas y cervix sano. Y en 9 categorías, aquí, las muestras de eversión glandular positivas se subdividieron en 6 categorías: VPH-16, VPH-18, VPH-18/16, co-infecciones y no definidos.

El microarreglo de tejidos nos permite analizar un gran número de muestras clínicas bajo las mismas condiciones experimentales, ya que reciben el mismo tratamiento, las mismas concentraciones de los anticuerpos y el tiempo de revelado, disminuyendo el error que se puede tener al realizarlas por separado.

Cuando observamos la inmunohistoquímica contra L1 de VPH en los microarreglos podemos ver una amplia gama de positividad, sin embargo, esta positividad tiende a ser nuclear y conforme es mayor tiende a observarse en el citoplasma (Figura 32). Para poder hacer un primer acercamiento de los niveles de expresión observados en el microarreglo hicimos un análisis cualitativo, para ello, formamos 4 categorías de positividad: positividad 0: >5%, positividad 1: 5-24%, positividad 2: 25-49%, positividad 3: 50-74% y positividad 4: 75-100%. Al hacer el manualmente el conteo del número de células cilíndricas positivas en las muestras de eversión glandular determinadas como VPH negativas encontramos que: 5 (55.55%) tenían positividad 1, 2 (22.22%) tenían positividad de 2, 1 (11.11%) tenía positividad 3 y 1 (11.11%) tenía positividad 4. Mientras que, para las muestras de eversión glandular determinadas como VPH positivas encontramos que: 6.38% tenían positividad 0, 29.79% tenían positividad 1, 17.02% tenían positividad 2, 29.79% tenían positividad 3 y 17.02% tenían positividad 4. Estos resultados nos indican que existe una diferencia en los niveles de expresión de la proteína L1 de VPH, sin embargo, no es clara la diferencia entre las eversiones glandulares determinadas como VPH positivas y VPH negativas.

El análisis cuantitativo nos permite determinar con mayor certeza si existe una diferencia en los niveles de expresión de la proteína de la cápside viral en las muestras de eversión glandular. Los datos obtenidos del análisis densitométrico fueron clasificados inicialmente en 4 grupos o categorías: carcinomas de cérvix (CaCu), cérvix sano en el que se incluyen el endocérvix de las histerectomías y el exocérvix sano, las eversiones glandulares HPV positivas y las eversiones glandulares VPH negativas. La grafica resultante de estos datos se muestra en la figura 32, aquí podemos observar que las muestras de eversión glandular VPH negativas tienen una densidad x área (IOD) menor que las muestras VPH positivas, aproximadamente 45000 vs 25000 y esta diferencia es estadísticamente distinta.

Sin embargo, cuando vemos los resultados densitométricos de las muestras de tejido cervical sano podemos ver que la densidad x área (IOD) es de aproximadamente 75000, es decir, mayor que la observada en las muestras de eversión glandular VPH positivas. Mientras tanto, en las muestras de carcinomas cervicales la densidad x área es de aproximadamente 35000, menor que la presentada por el tejido cervical sano y las muestras de eversión glandular VPH positivas, pero mayor a la presentada por las muestras VPH negativas. Con este análisis podemos decir que existe una diferencia en los niveles de expresión de la proteína L1 de VPH en las muestras de eversión glandular determinadas como VPH positivas y VPH negativas.

En la segunda clasificación de los datos obtenidos del análisis densitométrico se formaron 9 categorías, aquí, las muestras VPH positivas se dividieron en VPH-16, VPH-18, la co-infección VPH-16/18, otras co-infecciones (VPH-18/6/11, VPH-18/42), otros tipos de VPH (VPH-43, VPH-97) y aquellos que no pudieron ser definidos. Más las tres categorías previamente definidas. La gráfica de barras de la figura 32 representa los datos densitométricos con esta segunda clasificación, podemos ver que en las eversiones glandulares la densidad x área (IOD) es mayor en aquellas determinadas como infectadas por otros tipos virales, seguida por las determinadas como VPH-16, las co-infecciones primero las que tienen otros tipos virales y después las que son VPH-18/16, en las que no se identificó el tipo viral y por último con la menor densidad x área (IOD) esta VPH-18.

8.8.2. Búsqueda de cambios que puedan indicar una posible transformación maligna

Las células normales deben adquirir una serie de capacidades para transformarse en una célula maligna. Hanahan D y Weinberg R. A en el 2000 proponen la adquisición de seis capacidades biológicas durante el desarrollo de un tumor, estas "Hallmarks" incluyen: señalización proliferativa sostenida, resistencia a la muerte celular, potencial replicativo ilimitado, evasión de supresores de crecimiento, inducción de la angiogénesis y activación de la invasión y la metástasis.^{50,112}

Ki67 es un marcador de proliferación celular, el anticuerpo monoclonal Ki-67 detecta un antígeno nuclear que se encuentra presente exclusivamente en las células en proliferación.⁴⁶ Como acabamos de mencionar, la proliferación sostenida es uno de los pasos hacia el camino de la transformación maligna, dado que no podemos determinar si la proliferación es sostenida, entonces, lo que podemos determinar es si existe una diferencia en el número de células que se encuentran en proliferación en las muestras de eversión glandular infectadas con VPH. Una diferencia en la proliferación podría comenzar a darnos pistas de que algo está ocurriendo en esas células.

Para determinar la proliferación en nuestras muestras de eversión glandular vamos a emplear el anticuerpo Ki-67, la inmunohistoquímica con Ki-67 en los microarreglos muestra una amplia gama de positividad, esta positividad es nuclear tal como se habría de esperar (Figura 33). Nuevamente, el primer acercamiento de los niveles de expresión en el microarreglo fue un análisis cualitativo, para ello, empleamos las 4 categorías de positividad: positividad 0: >5%, positividad 1: 5-24%, positividad 2: 25-49%, positividad 3: 50-74% y positividad 4: 75-100%. Al hacer el manualmente el conteo de células cilíndricas positivas encontramos que: de las muestras de eversión glandular determinadas como VPH negativas 6 (66.66%) tenían positividad 0, 1 (11.11%) tenía positividad 1, 1 (11.11%) tenían positividad de 2, 1 (11.11%) tenía positividad 3 y ninguna con positividad 4. Mientras que, para las muestras de eversión glandular determinadas como VPH positivas 21.56% se clasificaron dentro de la positividad 0, 16.61% dentro de la positividad 1, 25.49% en la positividad 2, 17.65% en la positividad 3 y 15.69% en la positividad 4. Estos resultados nos indican que existe una diferencia en los niveles de expresión del antígeno nuclear Ki-67 indicativo de proliferación, por lo tanto podemos decir que se observa una diferencia en los niveles de proliferación entre las eversiones glandulares determinadas como VPH positivas y VPH negativas.

A través del análisis cuantitativo podremos determinar si la diferencia observada anteriormente es real y que existe una diferencia en los niveles de expresión de Ki-67 y por lo tanto de proliferación en las muestras de eversión glandular. Los datos obtenidos del análisis densitométrico fueron clasificados inicialmente en 4 grupos o categorías: carcinomas de cérvix (CaCu), cérvix sano

en el que se incluyen el endocérvix de las histerectomías y el exocérvix sano, las eversions glandulares VPH positivas y las eversions glandulares VPH negativas. La grafica resultante de estos datos se muestra en la figura 33, podemos observar que las muestras de eversión glandular VPH positivas tienen una densidad x área (IOD) mayor que las muestras VPH negativas, aproximadamente 2700000 vs 1700000 respectivamente, esta diferencia es estadísticamente significativa. Cuando observamos los resultados densitométricos de las muestras de tejido cervical sano podemos ver que la densidad x área (IOD) es de aproximadamente 1800000, es decir, mayor que la observada en las muestras de eversión glandular VPH negativas. Mientras que en las muestras de carcinomas cervicales la densidad x área (IOD) es de aproximadamente 2200000, mayor que la presentada por el tejido cervical sano y las muestras de eversión glandular VPH negativas, pero menor a la presentada por las muestras VPH positivas. Con este análisis corroboramos la observación inicial que existe una diferencia en la presencia del antígeno nuclear Ki-67 indicándonos un aumento en la proliferación en las muestras de eversión glandular determinadas como VPH positivas.

Empleado la segunda clasificación previamente determinada se graficaron los datos obtenidos del análisis densitométrico. La gráfica de barras de la figura 33 representa los datos densitométricos con esta clasificación, podemos ver que en las eversions glandulares la densidad x área (IOD) es mayor en aquellas muestras determinadas como infectadas por otros tipos virales, es seguida por las determinadas como VPH-16, las muestras determinadas como VPH-18 y de manera muy cercana por las co-infecciones VPH-18/16, las VPH no definido y las co-infecciones con otros tipos virales.

Otra de las “Hallmarks” propuestas por Hanahan y Weinberg en el 2000 y corroboradas en el 2011 es la evasión de la muerte celular. La maquinaria apoptótica puede ser dividida en 2 clases de componentes: los sensores y los efectores.

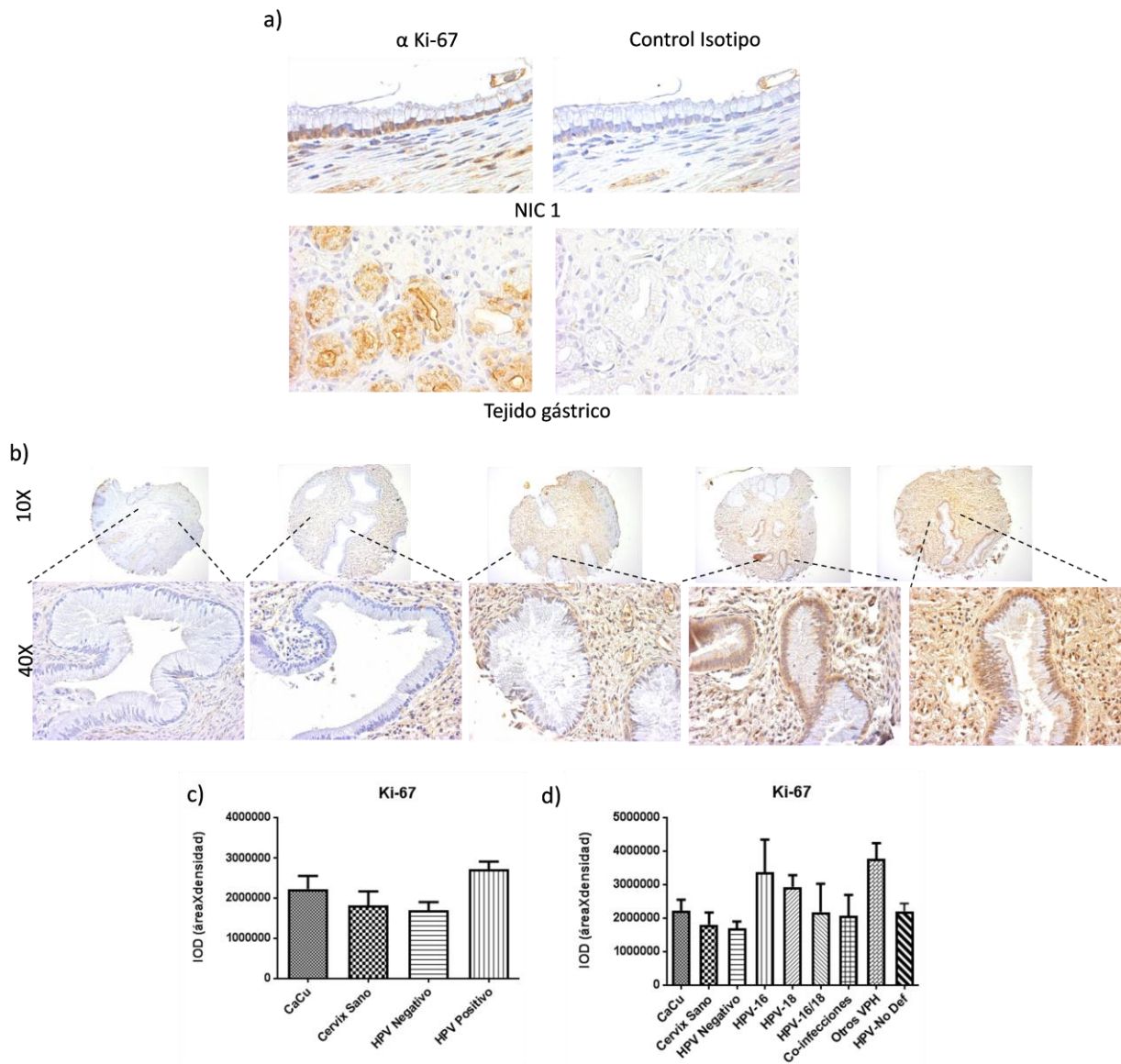


Figura 33. Inmunohistoquímica contra Ki-67. a) Estandarización. Sse muestra la concentración de 1:250 del antígeno monoclonal anti-human Ki-67 e IgG de ratón como control de isotipo en epitelio escamoso del cérvix y en tejido gástrico. b) Foto-composición de la expresión de Ki-67 en el microarreglo de tejidos. Se muestran distintos niveles de positividad en las muestras de eversión glandular, en la parte superior se muestra el punto (spot) completo en 10X y en la parte inferior se muestra una región en 40X. c) Análisis densitométricos de la expresión de Ki-67. Los datos obtenidos de la cuantificación de la densidad x área se clasificaron en: CaCu, muestras de eversión glandular VPH negativas, VPH positivas y cérvix sano. d) Expresión de Ki-67 en el microarreglo de tejidos. Los datos obtenidos de la cuantificación de la densidad x área se organizaron en las muestras de eversión glandular positivas en 6 categorías: VPH-16, VPH-18, VPH-18/16, co-infecciones y no definidos.

Los primeros son los responsables de monitorear el medio intracelular y extracelular que indican normalidad o una anomalía y que influyen cuando la célula debe vivir o morir. Los efectores incluyen un grupo de proteasas intracelulares llamadas caspasas, las caspasas -8 y -9 disparan activación de una docena o más caspasas que ejecutan la muerte programada a través de la destrucción de estructuras subcelulares, organelos y el genoma.⁴⁹ Las células tumorales han desarrollado varias estrategias para evadir la muerte celular programada, entre ellas la sobre-expresión de inhibidores de la apoptosis: miembros de la familia Bcl-2 y la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP's por sus siglas en inglés Inhibitor of Apoptosis Protein).

La survivina pertenece a la familia de las IAP's, y ejerce su efecto apoptótico primario por su unión e inhibición de las caspasas 3 y 7, también se ha demostrado que survivina puede asociarse con los microtúbulos del huso mitótico y que la pérdida de esta interacción conlleva a la pérdida de la función antiapoptótica de la proteína. La expresión de survivina se ve incrementada en líneas celulares transformadas y en varios tipos tumorales, incluyendo el cáncer cervical.^{15,43,111}

Evaluaremos la presencia de la proteína survivina activa, es decir, aquella que se encuentra fosforilada en la treonina 34 en las muestras de eversión glandular, la inmunohistoquímica en los microarreglos revela una amplia gama de positividad, esta positividad se observa en el núcleo (Figura 34). El primer acercamiento de los niveles de expresión en el microarreglo fue el análisis cualitativo, empleamos las 4 categorías de positividad previamente definidas: positividad 0: >5%, positividad 1: 5-24%, positividad 2: 25-49%, positividad 3: 50-74% y positividad 4: 75-100%. Al hacer el manualmente el conteo de células cilíndricas positivas encontramos que: de las muestras de eversión glandular determinadas como VPH negativas 3 (33.33%) tenían positividad 1, 5 (55.55%) tenían positividad de 2 y 1 (11.11%) tenía positividad 3. Mientras que, para las muestras de eversión glandular determinadas como VPH positivas 4% se clasificaron dentro de la positividad 0, 20% dentro de la positividad 1, 34% dentro de la positividad 2, 30% dentro de la positividad 3 y 12% dentro de la positividad 4. Estos resultados nos indican que existe una diferencia en los niveles de expresión de la proteína

survivina fosforilada en la treonina 34 entre las eversions glandulares determinadas como VPH positivas y negativas.

A través del análisis cuantitativo podremos corroborar esta diferencia observada. Los datos obtenidos del análisis densitométrico se clasificaron en primera instancia en 4 categorías: carcinomas de cérvix (CaCu), cérvix sano en el que se incluyen el endocervix de las histerectomías y el exocervix sano, las eversions glandulares VPH positivas y las eversions glandulares VPH negativas. La grafica resultante de estos datos se muestra en la figura 34, donde podemos observar que las muestras de eversión glandular VPH positivas tienen una densidad x área (IOD) similar a la de las muestras VPH negativas. Cuando observamos los resultados densitométricos de las muestras de tejido cervical sano podemos ver que la densidad x área (IOD) disminuye de 25000 a aproximadamente 15000. Y en las muestras de carcinomas cervicales la densidad x área (IOD) la mayor 60000 aproximadamente. Con este análisis podemos ver que la observación inicial de que existe una diferencia en la presencia survivina fosforilada no es exacta, pues la diferencia entre las muestras de eversión glandular determinadas como VPH positivas y negativas no es estadísticamente significativa.

Para ver si existía una diferencia entre los diferentes tipos virales se realizó la subdivisión de los muestras VPH positivas, empleando la segunda clasificación previamente determinada se graficaron los datos obtenidos del análisis densitométrico. La gráfica de barras de la figura 34 representa los datos densitométricos con esta clasificación, podemos ver que en las eversions glandulares la densidad x área es mayor en aquellas muestras determinadas como infectadas por otros tipos virales, seguida por las muestras de eversión glandular no determinadas, después por las determinadas como VPH-16, las co-infecciones VPH-18/16, las co-infecciones con otros tipos virales y finalmente las muestras determinadas como VPH-18.

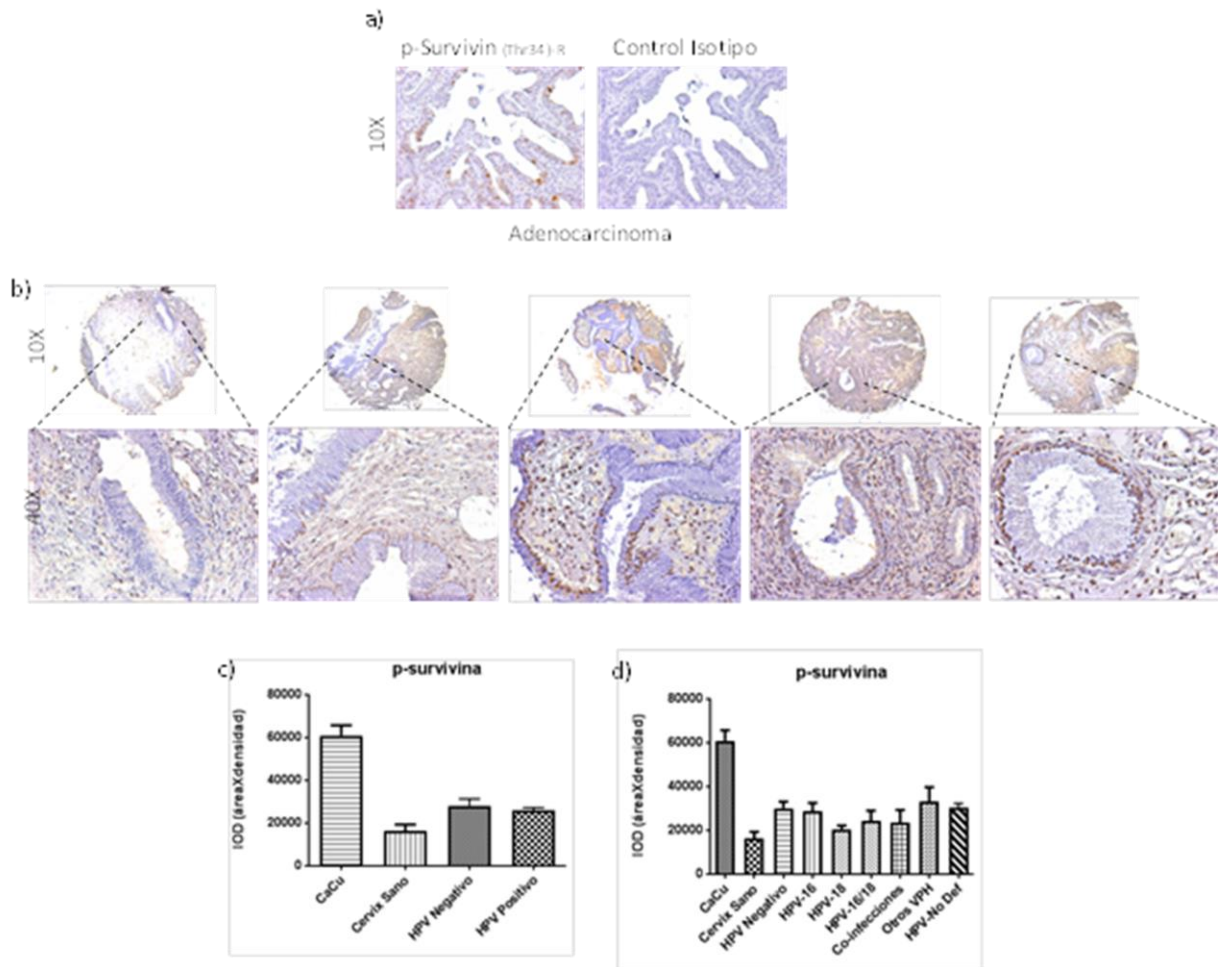


Figura 34. Inmunohistoquímica contra p-Survivina (Thr34)-R. a) Estandarización. Tejido de adenocarcinoma de cérvix fue empleado para la estandarización del anticuerpo contra survivina fosforilada en la treonina 34 con una concentración 1:500 e IgG de conejo como control de isotipo. b) Foto-composición de la expresión de p-survivina en el microarreglo de tejidos. Se muestran distintos niveles de positividad en las muestras de eversión glandular, en la parte superior se muestra el punto (spot) completo en 10X y en la parte inferior se muestra una región en 40X. c) Análisis densitométricos de la expresión de p-survivina. Los datos obtenidos de la cuantificación de la densidad x área se clasificaron en 4 categorías: CaCu, muestras de eversión glandular VPH negativas, VPH positivas y cérvix sano. d) Expresión de p-survivina en el microarreglo de tejidos. Se subdividieron las muestras de eversión glandular positivas en 6 categorías: VPH-16, VPH-18, VPH-18/16, co-infecciones y no definidos.

9. Discusión

La eversión glandular es la exposición del epitelio cilíndrico del endocérnix hacia el exocérnix y es considerada como una imagen normal del cérnix que es atribuida a fenómenos hormonales o reactivos, siendo más frecuente en la pubertad y durante el embarazo, por tal motivo podríamos esperar que la edad en nuestra población de estudio sea menor. Efectivamente, la edad promedio en el grupo de pacientes con diagnóstico de eversión glandular es de 28.5 menor que la de las pacientes con diagnóstico de cérnix sano (de las cuales tomamos una muestra de endocérnix) y de las pacientes con diagnóstico de infección con VPH.

La prevalencia de la infección con VPH está asociada con varios factores de riesgo, como la edad, el número de parejas sexuales y la edad de la primera relación sexual. Para determinar cuando la presencia de VPH es influenciada por adicionales factores de riesgo se analizaron también el número de embarazos, el número de partos y la edad de la menarca. Al observar la tabla 5 donde se presentan estos factores de riesgo para la infección con VPH y el desarrollo de cáncer de cérnix, encontramos que al comparar los datos reportados entre las pacientes con eversión glandular, endocérnix sano e infectadas con VPH no hay una diferencia estadísticamente significativa en la edad, edad de la menarca, edad de inicio de la vida sexual activa (IVSA), número de parejas sexuales, número de embarazos y partos. Por lo cual podemos asumir la diferencia que se presenta en la presencia de VPH no es debida a diferencias en los factores de riesgo dentro de nuestra población de estudio. La única diferencia estadísticamente significativa se encuentra en el uso de anticonceptivos hormonales, siendo el mayor porcentaje el reportado por el grupo de eversión glandular (17.1%) este comportamiento ha sido previamente reportado, el uso de anticonceptivos hormonales ha sido asociado con la presencia de la eversión glandular, su persistencia y el tamaño.^{12,17,26,58,79} Podríamos concertar, entonces que, la presencia de la eversión glandular se asocia con el aumento en la concentración de hormonas ya sean propias o sintéticas.

Recordemos que la eversión glandular se considera un hallazgo normal en el cérvix, por lo cual esperaríamos que la presencia de VPH se encontrara dentro del intervalo reportado para un cérvix sano, el cual a nivel mundial es del 2% al 44%. Sin embargo, los resultados obtenidos de las PCR universales para la detección del VPH: MY09/MY11 y L1C1/L1C2, nos muestran que hay una alta proporción de muestras infectadas, esta proporción es aún mayor a la previamente reportada por el grupo de trabajo de la Dra. Leticia Rocha.¹⁰⁰ El porcentaje de muestras determinadas como VPH positivas empleando el juego de oligonucleótidos MY09/MY11 fue de 54.46%, las muestras que no amplificaron con estos oligonucleótidos fueron sometidas a una nueva PCR empleando esta vez los oligonucleótidos L1C1/L1C2, 37 (36.63%) de las muestras amplificaron el producto esperado de 260-268 pb, por lo que la proporción final de muestras determinadas como positivas aumento a 90.1% (91 muestras VPH positivas). Mientras que en el trabajo previo realizado en el laboratorio de la Dra. Rocha se usó únicamente el juego de oligonucleótidos MY09/MY11 reportando que el 23.3% de muestras de eversión glandular fueron positivas a VPH, aunque esta positividad podría parecer alta se encuentra dentro del intervalo de positividad reportado para un cérvix sano.

Al analizar un poco más detenidamente la tabla 6, podemos ver que el porcentaje de muestras de eversión glandular determinadas como VPH positivas es estadísticamente igual al presentado por las muestras de infección con VPH (90.1% vs 91.84%), el porcentaje de positividad a VPH en las muestras determinadas como infección a VPH (pertenecientes a LSIL) se encuentran dentro del intervalo reportado que va de 42.3% a 93.3% para NIC1.^{7,65} Mientras que, al comparar el porcentaje de muestras de eversión glandular positivas a VPH contra el porcentaje de positividad de las muestras de endocérvix podemos ver que es estadísticamente distinto (90.1% vs 35.88%), el porcentaje de positividad a VPH del endocérvix puede parecer alto, sin embargo, al revisar en la bibliografía podemos ver que el intervalo reportado es del 0% al 52%, por lo cual nuestra positividad a pesar de parecer alta se encuentra dentro del intervalo de positividad previamente reportado.^{13,116}

Entonces, tenemos que los porcentajes de positividad de las muestras de IVPH y endocérvix a pesar de parecer altos se encuentran dentro de los rangos de positividad a VPH previamente reportados. Recordemos, que un cérvix con el hallazgo de una eversión glandular se considera un cérvix normal, pero, el porcentaje de las muestras con diagnóstico de eversión glandular (90.1%) no corresponden a la positividad reportada para un cérvix sano. Con estos resultados podemos suponer que al tener una eversión glandular tenemos la misma probabilidad de tener una infección con VPH que si tuviésemos un diagnóstico de infección con VPH.

No encontramos trabajos previos en los cuales se realizara la determinación de los tipos virales de VPH en la eversión glandular, por lo cual nuestros resultados son únicos. Al comenzar a analizar los resultados de la tipificación lo primero que resalta es que en las muestras con eversión glandular el tipo viral más frecuente es VPH-18 (solo o en una infección múltiple con un tipo de bajo o alto riesgo) siendo 64 (70.33%) el número de muestras positivas a VPH-18, mientras que aquellas tipificadas como VPH-16 fueron 4 (4.39%) y consideramos por separado 4 muestras que tienen la co-infección VPH-18/16 (4.39%). A diferencia de nuestros resultados, encontramos reportes en los cuales en el endocérvix sano el tipo viral más frecuente es el VPH-16.^{124,125} Mientras que, por otro lado, el tipo viral más frecuente en los adenocarcinomas es el VPH-18, recordemos que el lugar donde ese origina el adenocarcinoma es el epitelio cilíndrico que recubre el endocérvix y que puede ser evertido dando lugar a la eversión glandular.^{3,116} ¿Será posible que el VPH-18 sea más agresivo o que transforme más frecuentemente a las células cilíndricas y por lo cual es más frecuente en el adenocarcinoma? Entonces, ¿las eversiones glandulares infectadas con VPH-18 son propensas a la transformación?

En los resultados obtenidos de las muestras de infección con VPH podemos ver que el mayor número de muestras pertenecen al tipo viral VPH-16 con 32 (35.5%), mientras que el número de muestras VPH-18 son 18 (20%) y las co-infecciones VPH-18/16 son 20 (22.22%) mayor que las encontrada en las muestras de eversión glandular. Estos resultados están de acorde con el comportamiento visto en las LSIL donde el tipo viral más frecuentemente encontrado es el VPH-16,

también concuerda con los varios reportes que determinan que el tipo viral que se encuentra más frecuentemente en el carcinoma cervical es el tipo VPH-16.^{7,65} Recordemos que el epitelio donde se origina este carcinoma es epitelio estratificado, del mismo de donde tomamos la muestra de tejido del grupo infección con VPH.

Cuando analizamos el endocérvix diagnosticado como sano podemos ver que de las 47 muestras VPH positivas 31 (65.96%) son del tipo VPH-18 y sólo 1 (2.13%) es del tipo VPH-16. Esta proporción es similar a la presentada por las eversiones glandulares. Considerando nuestros resultados podemos pensar que efectivamente puede existir un tropismo de los tipos virales por cierto epitelio: VPH-18 por el epitelio cilíndrico y VPH-16 por el epitelio estratificado.

Debido al gran número de muestras que fueron determinadas como VPH-18 se realizó la corroboración del tipo viral a través de PCR's específicas que amplifican en tres distintas regiones dentro del genoma viral, al analizar los resultados podemos observar que el 95.65% de las 46 muestras analizadas se pudieron amplificar, entonces, podemos decir que la positividad del tipo VPH-18 determinada es correcta. Es posible que las 2 muestras que no pudieron ser amplificadas hayan sufrido degradación del material. Dado que no se analizaron las 22 muestras restantes determinadas como VPH-18, entonces, tomando en consideración los resultados obtenidos podemos inferir que puede haber 1 muestra más que no haya amplificado, lo cual haría un total de 3 muestras negativas a VPH-18, para quedar un total de 65 (71.43%), lo cual no es estadísticamente distinto de las 68 (74.72%) muestras inicialmente determinadas como VPH-18.

Además de los tipos virales VPH-16 y VPH-18 tenemos otros tipos virales que pertenecen al grupo de alto riesgo. De las muestras de eversión glandular 8 fueron positivas para otros tipos virales de alto riesgo: 2 (2.2%) VPH-51, 1 (1.1%) VPH-56, 3 (3.3%) VPH-66 y 2 (2.2%) VPH-52. Para las muestras de IVPH encontramos 3 muestras con algún otro tipo de alto riesgo: 2 (2.22%) VPH-51 y 1 (1.11%) VPH-66. Finalmente de las muestras de endocérvix tenemos 9 muestras con algún tipo perteneciente al grupo de alto riesgo: 2 (4.25%) VPH-31, 1 (2.13%) VPH-51, 1 (2.13%)

VPH-53, 2 (4.25%) VPH-56, 1 (2.13%) VPH-58, 2 (4.25%) VPH-66. Al analizar el número total de muestras con uno o más de VPH clasificados como de alto riesgo tenemos que 73 (80.22%) de las muestras de eversión glandular tienen al menos 1 tipo viral de alto riesgo, este hallazgo es sorprendente y sin precedente, pues la presencia de VPH reportada previamente es mucho menor a la reportada en este trabajo y no se habían realizado una búsqueda exhaustiva de los tipos virales.

Siguiendo con el análisis de los tipos virales de alto riesgo encontramos en el grupo de IVPH 73 muestras con al menos un tipo de alto riesgo el mismo número que el observado en las eversiones glandulares, representa el 81.1% y es estadísticamente igual al porcentaje de las muestras de eversión glandular. Por otro lado, en las muestras de endocérvix 41 (87.23%) de las muestras tienen un tipo viral de alto riesgo.

También, encontramos una muestra de eversión glandular y de endocérvix, es decir aquellas compuestas por epitelio cilíndrico con VPH-97. Un tipo que tiene poco tiempo de haber sido determinado y cuyo riesgo para desarrollar cáncer es aún es desconocido, pero que está relacionado con los tipos virales de alto riesgo y pertenecientes al grupo a7: VPH-45 y VPH-18. Además de este particular tipo viral encontramos en las muestras de endocérvix 3 (6.38%) muestras más pertenecientes a un tipo de riesgo no determinado cada una perteneciente a los tipos virales VPH-90, VPH-SDL10 y VPH-MM8.

Al analizar la presencia de virus de bajo riesgo encontramos que 12 (13.19%) de las muestras de eversión glandular tienen un tipo viral de bajo riesgo (solo o en una co-infección con un tipo viral de alto riesgo), 2 (2.2%) VPH-42, 8 (8.79%) VPH-43 y 2 (2.2%) VPH-6/11. Mientras que en el grupo de IVPH se encontró una sola muestra (1.11%) perteneciente al VPH-11 y no se determinó la presencia de virus de bajo riesgo en el grupo de endocérvix.

Por último, trataremos los resultados obtenidos por medio de la PCR múltiple anidada para la determinación de infecciones múltiples en las eversiones glandulares. Logramos determinar la presencia de infecciones múltiples en 17

muestras que corresponden al 18.68%, de las cuales: 14 (15.38%) tienen una infección doble y 3 (3.3%) una infección triple. Todas las co-infecciones son portadoras de por lo menos 1 tipo viral de alto riesgo, siendo el VPH-18 determinado en 16/17 muestras y sólo 1/17 muestras con el VPH-51. Al comparar con el trabajo de Sotlar¹¹² en el cual reporta que el 40% de las muestras de mujeres VPH positivas pero sin evidencia de displasia tienen infecciones múltiples; o al comparar con el trabajo de Carrillo-García¹⁶ en el cual se reporta que el 40.1% del grupo que comprende mujeres negativas a lesiones intraepiteliales o malignidad (NILM) y lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL) tienen infecciones múltiples; o el intervalo citado por Vaccarella¹¹⁹ que va del 20% al 50% de infecciones múltiples en el cérvix, entonces, la detección de muestras con infecciones múltiples en las eversions glandulares es menor. Sin embargo, existen reportes que determinan un porcentaje menor de infecciones múltiples, como el trabajo de Jalal Kiani⁵⁹ quien en carcinomas determina empleando esta misma técnica de PCR múltiple anidada infecciones múltiples en 10.6% de sus muestras; o el trabajo de Mena⁷⁴ quien reporta que el 15% de mujeres con diagnóstico de infección por VPH tienen una infección múltiple. Cuando analizamos los tipos virales presentes en las infecciones múltiples reportados por Carrillo-García¹⁶ lo primero que podemos ver es que el porcentaje de virus de alto riesgo encontrados en las infecciones múltiples del grupo NILM/LSIL es de 30.5%, mientras que, el porcentaje de virus de alto riesgo determinado en las infecciones múltiples de nuestro grupo de eversions glandulares es del 100% (todas las muestras tienen al menos un virus de alto riesgo), lo siguiente que podemos ver es que en las infecciones múltiples del grupo NILM/LSIL el tipo viral más frecuentemente encontrado es el VPH-16, lo cual no observamos en nuestras muestras de eversión glandular, donde el tipo más frecuente es el tipo 18. Este hecho puede ser atribuido a que el epitelio de donde se tomaron las muestras es distinto, escamoso vs cilíndrico, y nuevamente volvemos a ver un tropismo específico para cada tipo viral. Finalmente, quiero mencionar que 9/17 muestras con infecciones múltiples son portadoras de dos tipos virales de alto riesgo, se ha reportado que la presencia de 2 o más virus de alto riesgo incrementa la probabilidad de desarrollo de cáncer.¹⁶

El microarreglo de tejidos resultó ser una herramienta muy útil, ya que nos permitió disminuir el sesgo de los resultados debidos a errores de medición. La positividad observada en la inmunohistoquímica empleando el anticuerpo contra la proteína L1 de la cápside viral nos revela la presencia del virus, en el epitelio escamoso lo podemos ver cómo habría de esperarse en el citoplasma de los estratos superiores, donde se expresan los genes tardíos y se da el ensamblaje del virus (Figura 32). Sin embargo, en las muestras de eversión glandular se puede ver que la proteína se encuentra en el núcleo de las células cilíndricas, con esto podemos corroborar que la expresión de proteínas tardías, en particular la expresión de L1 se da en el epitelio cilíndrico y hace pensar que el ciclo del virus se ve modificado, pues la proteína se encuentra en el núcleo y no en el citoplasma.

Como es de esperar la presencia de la proteína L1 se ve disminuida en las muestras de los carcinomas, esto puede ser atribuido al hecho de en la mayoría de los carcinomas hay una infección abortiva, es decir, no se da la producción de viriones. Un resultado inesperado lo observamos en las muestras de cérvix sano, estas muestras tienen la mayor positividad de aproximadamente 75000. Los resultados que esperaríamos son que la densidad x área (IOD) en estas muestras fuera la más baja, pues en principio no debería haber virus, este hecho nos hace pensar que las muestras a pesar de tener el diagnóstico de cérvix sano tanto colposcópicamente como histológicamente pertenecen al porcentaje de muestras "sanas" VPH positivas, este porcentaje va del 2 al 44% con una media de 10.4%.¹²² Cuando observamos la representación gráfica de los datos del análisis densitométrico en la figura 32 de las muestras de eversión glandular con diagnóstico de VPH negativo podemos ver que la densidad x área (IOD) es de 25000 la menor que la observada en las muestras de eversión glandular VPH positivas, tal como es de esperar.

Al hacer la subdivisión de las muestras determinadas como VPH positivas en 6 grupos podemos ver que: en las muestras con un VPH de bajo riesgo la producción de viriones es la mayor (IOD=70000) y que disminuye cuando a estos tipos de bajo riesgo los co-infectamos con VPH-18 (IOD=60000). La producción de viriones en las muestras determinadas con VPH-16 también es alta (IIOD=65000) y

al ser co-infectadas con VPH-18 disminuye (IOD=50000). Y la producción más baja de viriones se da en las muestras determinadas como VPH-18 (IOD 35000), recordemos que 52 (57.14%) de las muestras de eversión glandular tienen una infección única con VPH-18, es decir, en estas muestras hay una baja expresión de la proteína L1 que compone la cápside viral.

Ki-67 es un marcador de proliferación celular y el índice (número células positivas/ número células negativas) es empleado como un factor pronóstico del crecimiento del tumor. La presencia de Ki-67 es nuclear como se es de esperar, la positividad es alta (IOD=2200000) en las muestras de los carcinomas, esto es lo que se puede esperar, pues los carcinomas se encuentran en proliferación constante. Nuevamente podemos ver que en las muestras de cérvix sano se da un resultado no esperado, es decir, la positividad a Ki-67 es superior a la esperada, pues en un tejido sano el índice de proliferación es cercano a 0, pero, si asumimos que algunas de estas muestras a pesar de tener un diagnóstico "sano" colposcópicamente e histológicamente son VPH positivas, los datos concuerdan con lo observado, es decir, tienen una positividad mayor a la positividad a la esperada en un tejido sano y a la observada en las muestras VPH negativas pero esta positividad es menor que la de los carcinomas. Al ver la representación gráfica en la figura 33 de los datos del análisis densitométrico de las muestras de eversión glandular con diagnóstico de VPH negativo podemos ver que la IOD (IOD=1700000) es menor que la determinada en las muestras VPH positivas (IOD=2700000), lo cual nos revela que los niveles de proliferación en las muestras VPH positivas es mayor que la presentada por las muestras VPH negativas. De hecho cuando comparamos las IOD de las muestras VPH positivas con las muestras de carcinomas, las primeras presentan una mayor IOD, es decir, presentan una mayor positividad o proliferación que incluso los carcinomas.

A hacer la subdivisión de las muestras determinadas como VPH positivas en 6 grupos podemos encontrar que la mayor expresión se da en las muestras con otros tipos virales, seguida por las determinadas como VPH-16 y VPH-18 y finalmente las muestras con co-infecciones, estos resultados nos sorprenden, dado que la disminución de la producción de viriones está relacionada con la infección abortiva, la integración y la sobre-expresión de E6 y E7, entonces, se esperaría

que la proliferación fuese mayor en aquellas con los tipos virales de alto riesgo, de hecho podríamos esperar que las muestras con los tipos VPH-18 fueran las de mayor proliferación, pues como vimos son las que tienen una menor producción de viriones (expresión de L1).

La survivina fosforilada en la treonina 34 es la forma activa de esta IAP, por lo tanto, lo que estamos determinando con la inmunohistoquímica en los tejidos es la actividad de la survivina. Como se ha observado en cáncer de cérvix la expresión de p-survivina es alta, mientras que en la muestras de cérvix sano si bien la expresión no es de cero es más baja. Sin embargo, al analizar la expresión en las muestras de eversión glandular podemos ver que la expresión es mayor en las muestras VPH negativas comparada con las muestras VPH positivas pero esta diferencia es pequeña y no es estadísticamente significativa. Al subdividir las muestras de eversión glandular VPH determinadas como positivas para ver si encontramos alguna diferencia significativa encontramos que la mayor expresión de da en las muestras con diagnóstico de otros tipos virales, seguido por las muestras VPH-16, las co-infecciones y finalmente la menor expresión de p-susvivina en las muestras VPH-18, las diferencias no son estadísticamente significativas excepto para otros tipos virales y VPH-18. En este sentido, la expresión de p-survivina ha sido controversial cuando se trata de las lesiones precursoras de cáncer, pues hay quienes han encontrado una correlación entre la expresión de survivina y el grado de la lesión mientras que hay otros grupos que no determinan una relación.¹⁵

10. Conclusiones

Los datos reportados de las pacientes incluidas en nuestra población de estudio nos indican que no existen diferencias significativas en los factores de riesgo para la infección con VPH y el desarrollo de cáncer de cérvix que pudieran dar lugar a un sesgo en los resultados de nuestro trabajo.

Corroboramos la observación previamente realizada que nos indica que existe una relación entre el consumo de anticonceptivos hormonales y la presencia de la eversión glandular.

La presencia de VPH en las muestras con diagnóstico de eversión es alta (90.1%), similar a la determinada en muestras diagnosticadas como Infecciones con VPH (91.84%) y distinta a la determinada para las muestras de endocérnix diagnosticadas como sanas (35.88%).

El VPH-18 es el tipo viral más frecuente en las eversiones glandulares, el 74.72% de las muestras tiene el tipo viral VPH-18 ya sea como infección única o como una infección múltiple.

El 80.22% (73/91) muestras de eversión glandular son portadoras de al menos un tipo viral perteneciente al grupo de alto riesgo. Este es un hallazgo sin precedente, pues no se tienen reportes que hayan realizado una búsqueda exhaustiva de los tipos virales en las eversiones glandulares.

Se determinó por primera vez la presencia de infecciones múltiplex en eversiones glandulares del cérvix. En el 18.68% de estas muestras se determinó la presencia de infecciones múltiples: 15.38% infecciones dobles y 3.33% de infecciones triples. Todas las infecciones múltiples tienen por lo menos un tipo viral de alto riesgo, siendo el VPH-18 el más frecuente.

Los datos obtenidos de la inmunohistoquímica contra la proteína L1 de VPH en el microarreglo de tejidos nos revelaron la presencia del virus en el tejido de eversión glandular y la localizaron en el núcleo de las células cilíndricas.

La expresión de la proteína mayoritaria de la cápside L1 Fue estadísticamente mayor en las muestras de eversión glandular determinadas como VPH positivas que la expresión determinada en las muestras VPH negativas.

La expresión de la proteína L1 de VPH fue menor en las muestras determinadas como VPH-18. Y cuando otro tipo viral es co-infectado con VPH-18 disminuye su expresión.

La proliferación determinada empleando Ki-67 es estadísticamente mayor en las muestras de eversión glandular determinadas como VPH positivas comparadas con las muestras determinadas como VPH negativas.

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de survivina fosforilada en la treonina 34 (survivina activa) entre las muestras determinadas como VPH positivas y VPH negativas.

11. Bibliografía

1. Alonso R.P, Lazcano P.E., Hernández A.M., Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. 1ª Edición. Editorial Médica Panamericana. México DF. 2000.
2. Al-Riyami A, Afif M, Morsi M, Marby R. A national study of gynecological morbidities in Oman. Effect of women autonomy. Saudi Med J. 2007; 28(6):881-90.
3. Andersson S, Rylander E, Larson B, Sigurdardóttir S, Backlund I, Sallstrom J, Wilander E. Types of human papillomavirus revealed in cervical adenocarcinomas after DNA sequencing. Oncology Reports. 2003. 10: 175-179.
4. Apgar B.S, Brotzman G.L, Spitzer, M. Colposcopia. Principios y práctica. 1ª Edición. Editorial Mc Graw Hill. 2003
5. Arya O.P, Mallinson H, Goddard A.D. Epidemiological and clinical correlates of chlamydial infection of the cervix. Br J Vener Dis. 1981;57(2):118-24.
6. Bareman J.G, Koutsky L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. Journal of Clinical Virology. 2005; 32S: S16-S24.
7. Bhatla N, Dar L, Rajkumar Patro A, Kumar P, Pati S.K, Kriplani A, Gulati A, Broor S, Iyer V.K, Mathur S, Shah K.V, Gravitt P.E. Human papillomavirus-type distribution in women with and without cervical neoplasia in north India. Int J Gynecol Pathol. 2008; 27(3):426-430.
8. Belifore P, Costa E, De Cantis S, Vassallo R, Marino A. Effectiveness and persistence of a topical treatment for cervical ectropion with deoxyribonucleic acid. Minerva Ginecol. 2005; 57(4):461-6.
9. Blythe M.J, Katz BP, Orr D.P, Caine V.A, Jones RB. Historical and clinical factors associated with Chlamydia trachomatis genitourinary infection in female adolescents. J Pediatr. 1988 Jun;112(6):1000-4.
10. Bodily J and Laimins L.A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. Trends in Microbiology. 2011; 19 (1): 33-39.
11. Bontis J, Vavilis D, Panidis D, Theodoridis T, Konstantinidis T, Sidiropoulou A. Detection of Chlamydia trachomatis in asymptomatic women: relationship to history, contraception, and cervicitis. Adv Contracept. 1994; 10(4): 309-15.
12. Bright P.L, Norris Tuner A, Morrison D.S, Wong EL, Kwok C, Yacobson I, Royce R.A, Tucker H.O, Blumental P.D. Hormonal contraception and area of cervical ectopy: a longitudinal assessment. Contraception. 2011; 84(5): 512-9.
13. Brink A.A, Meijer C.J, Wiegerinck M.A, Nieboer T.E, Kruitwagen R.F, Van Kemenade F, Franssen Daalmeijer N, Hesselink A.T, Sniders P.J. High concordance of results of testing for human papillomavirus in cervicovaginal samples collected by two methods, with comparison of a novel self-sampling device to a conventional endocervical brush. J Clin Microbiol. 2006. 44(7): 2518-23.

14. Brunham R.C, Kimani J, Bwayo J, Maitha G, Maclean I, Yang Ch, Shen C, Roman S, Nagelkerke N.J. D, Cheang M, Plummer F.A. The epidemiology of Chlamydia trachomatis within a sexually transmitted diseases core group. *JID* 1996; 173:950-6.
15. Calles M.C, Estudio del efecto del virus del papilloma humano en la expresion y fosforilación de la proteína survivina. Tesis UNAM. 2007.
16. Carrillo-García A, Ponce-de-León-Rosales S, Cantú-de-León D, Fragoso-Ontiveros V, Martínez-Ramírez I, Orozco-Collín A, Mohar A, Lizano M. Impact of human papillomavirus coinfections on the risk of high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer. *Gynecology Oncology*. 2014; 134:534-539.
17. Castle P.E, Jeronimo J, Scjiffman M, Herrero R, Rodríguez A.C, Bratti A.C, Hildesheim A, Wacholder S, Long LR, Neve L, Pfeiffer R and Burk RD. Age- related changes of the cervix influence human papillomavirus type disttrubution. *Cancer Res*. 2006. 66:1218-1224.
18. Castrejon-Lugardo R. Ectropión y su relación con el CaCu y sutratamiento homeopático. Publicación Emitida por: www.homeopatasmateo.com. 2006. <http://www.homeopatasmateo.com/publicaciones/ectropion.pdf>
19. Chacko MR, Lovchik JC. Chlamydia trachomatis infection in sexually active adolescents: prevalence and risk factors. *Pediatrics*. 1984 Jun;73(6):836-40.
20. Chen J, Zhou D, Liu Y, Peng J, Li C, Chen W, Wang Z. A comparison between ultrasound therapy and laser therapy for symptomatic cervical ectopy. 2008. *Ultrasound in Med & Biol*. 34(11); 1770-1774.
21. Chuaqui R, González S, Etchart M, Rosenberg H. Lecciones de anatomía patológica. Universidad Católica de Chile. 1991. publicacionesmedicina.uc.cl/AnatomiaPatologica/Indice.html
22. Clemetson D.B, Moss G.B, Willerford D.M. Detection of HIV DNA in cervical and vaginal secrefions. Prevalence and correlates among women in Nairobi, Kenya. *JAMA*.1993;269(22):2860-4.
23. Collier A.C, Handsfield H.H, Ashley R. Cervical butnot urinary excretion of cytomegalovirus is related to sexual activity and contraceptive practice in sexually active women. *J Infect Dis*. 1995; 171(1): 33-38.
24. Conde-González CJ, Uribe-Salas F. Gonorrea: la perspectiva clásica y la actual. *Salud Pública de México* 1997;39(6):1-7.
25. Cravioto M del C, Matamoros O, Villalobos-Zapata Y, Peña O, García-Lara E, Martínez M, Castelo J, Sifuentes-Osornio J. Prevalencia de anticuerpos anti-chlamydia Trachomatis y anti-neisseria gonorrhoeae en grupos de individuos de la población mexicana. *Salud Pública de México*. 2003; 45(S5): S681-9.
26. Critchlow C.W, Wölner-Hanssen P, Eschenbach D.A, Kiviat N.B, Koutsky L.A, Stevens C.E, Holmes K.K. Determinants of cervical ectopia and of cervicitis: age, oral contraception, specific cervical infection, smoking, and douching. *Am J Obstet Gynecol*. 1995 Aug;173(2):534-43.

27. Dallenbach-Hellweg G, Trunk M.J, Knebel-Doeberitz M.V. Histopatología del cuello uterino. Atlas a color. 2ª Edición. Editorial Ediciones Journal. 2006.
28. De Luca Brunori I, Urbano M, Romani L, Tarani A, Felipetto R, Battini L, Amato A, Andreoni P. Clinico-morphological changes in ectropion after treatment with polydeoxyribonucleotide (PDRN). *Ann Ostet Ginecol Med Periant.* 1990; 111(6):379-87.
29. De Luca Brunori I, Facchini V, Filippeschi M, Battini L, Giusti G, Romani L, Scida P, Urbano M. Cell-mediated immunity in the course of cervical ectropion. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 1994;21(2):105-7.
30. De Palo G. Colposcopia, patología y tratamiento del tracto genital inferior. 2ª Edición. Editorial Médica panamericana. 1996.
31. De Villiers E.M, Fauquet C, Broker T, Bernard H.U, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324: 17-27.
32. Di Stefano L, Patacchiola F, Palermo P, Marrone C, Mascaretti G. Ectropion of the uterine cervix in adolescence. Study of a topical drug as an alternative to surgical treatment. *Clin Ter.* 2002 Nov-Dec;153(6):381-3.
33. Donahue V.C. The cervical "erosion": myth and reality. *J Am Coll Health Assoc.* 1976;24(3):167-8.
34. Doorbar J. The papillomavirus live cycle. *Journal of Clinical Virology.* 2005; 32S: S7-S15.
35. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science.* 2006; 110: 525-541.
36. Dowe G, Smikle M, D King S, Wynter H, Frederick J, Hylton-Kong T. High prevalence of genital Chlamydia trachomatis infection in women presenting in different clinical settings in Jamaica: implications for control strategies. *Sex Transm Inf.* 1999;75:412-416.
37. Duttgupta C, Sengupta S, Roy M, Sengupta D, Chakraborty S, Bhattacharya P, Roy S, Ghosh S. Oncogenic human papillomavirus (HPV) infection and uterine cervical cancer: a screening strategy in the perspective of rural India. *European Journal of Cancer Prevention.* 2002; 11: 447-456.
38. Eymin G, Fich F. Enfermedades de transmisión sexual. 2003. publicacionesmedicina.uc.cl/TemasMedicinaInterna/pdf/EnfTransmisionSexual.pdf
39. Fields B. N, Knipe D. M, Howley P.M. Fields virology. 5a edición. Editorial Philadelphia: Wolters Healt/Lippincott Williams & Wilkins. 2007.
40. Filipp E, Raczyński P, El Midaoui A, Pawłowska A, Tarnowska-Madra U, Scholz A, Niemiec KT, Chamerski J. Chamydia trachomatis infection in sexually active adolescents and young women. *Med Wieku Rozwoj.* 2005; 9(1): 57-64.
41. Fish AN, Fairweather DV, Oriel JD, Ridgway GL. Chlamydia trachomatis infection in a gynaecology clinic population: identification of high-risk groups and the value of contact tracing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1989 Apr;31(1):67-74.

42. Fontela M, Rodríguez Y, Verdejas O.L, Valdés F.J. Infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres cubanas en edad reproductiva. *Rev Cubana Endocrinol.* 2006; 17(2).
43. Frost m, Jarboe M.S, Orlicky D, Gianani R, Thompson L.C, Enomoto T, Shroyer K.R. Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2002. 117: 738-744.
44. García-Acevez S.J, Chávez-Martínez M.A., Compendio y atlas de lesiones del cuello uterino: del VPH al cáncer cervicouterino. Editorial Intersistemas SA de CV. Lab. Médico del Chopo. 2008.
45. Geisler W.M, Chow J.M, Schachter J, McCormack W.M. Pelvic examination findings and *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic young women screened with a nucleic acid amplification test. *Sex Transm Dis.* 2007 Jun;34(6):335-8.
46. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation- associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology.* 1984. 133(4): 1710-1715.
47. Goldacre M.J, Loudon N, Watt B, Grant G, Loudun J.D.O, McPherson K, Vessey MP. Epidemiology and clinical significance of cervical erosion in women attending a family planning clinic. *Br Med J.* 1978;1 (6115):748-50.
48. Guerra-Infante F, Flores-Medina S, Arteaga-Troncoso G, Zamora-Ruiz A, López-Hurtado M, Ortiz-Ibarra F.J. Risk factors and reproductive sequelae associated with *Chlamydia trachomatis* infection in infertile women. *Salud Publica Mex.* 2003;45 Supp 5:S672-80.
49. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000. 7:100(1):57-70.
50. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. 2011. *Cell.* 144(5):646-74.
51. Handsfield H.H, Jasman L.L, Roberts P.L, Hanson VW, Kothenbeutel RL, Stamm WE. Criteria for selective screening for *Chlamydia trachomatis* infection in women attending family planning clinics. *JAMA.* 1986;255(13):1730-4.
52. Harrison H.R, Costin M, Meder J.B, Bownds L.M, Sim DA, Lewis M, Alexander ER. Cervical *Chlamydia trachomatis* infection in university women: relationship to history, contraception, ectopy, and cervicitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1985 Oct 1;153(3):244-51.
53. Harry V.N, Cruickshank M.E, Parkin D.E. Auditing the use of colposcopy versus general gynecology clinics to investigate women with postcoital and intermenstrual bleeding: a case for a new outpatient service. *J Low Genit Tract Dis.* 2007; 11(2):108-11.
54. Herrmann B, Espinoza F, Villegas RR, Smith GD, Ramos A, Egger M. Genital chlamydial infection among women in Nicaragua: validity of direct fluorescent antibody testing, prevalence, risk factors and clinical manifestations. *Genitourin Med.* 1996; Feb;72(1):20-6.

55. Hobson D, Karayiannis P, Byng RE, Rees E, Tait IA, Davies JA. Quantitative aspects of chlamydial infection of the cervix. *Br J Vener Dis.* 1980;56(3):156-62.
56. Huneeus A, Pumarino MG, Schilling A, Robledo P, Bofil M. Prevalencia de Chlamydia trachomatis y Neisseria gonorrhoeae en adolescentes chilenas. *Rev Méd Chile.* 2009; 137: 1569-1574.
57. Insinga R.P, Dasbach E.J, Elbasha E.H, Liaw K.L, Barr E. Incidence and duration of cervical human papillomavirus 6, 11, 16 and 18 infections in Young women: an evaluation from multiple analytic perspectives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16(4): 709-715.
58. Jacobson DL, Peralta L, Farmer M, Graham NM, Gaydos C, Zenilman J. Relationship of hormonal contraception and cervical ectopy as measured by computerized planimetry to chlamydial infection in adolescents. *Sex Transm Dis.* 2000; 27(6):313-9.
59. Jalal Kiani S. Detection and typing of human papilloma viruses by nested multiplex polymerase chain reaction assay in cervical cancer. *Jundishapur j microbial.* 2015. 26;8(12):e26441.
60. Kovacs G.T, Westcott M, Rusden J, Asche V, King H, Haynes S.E, Moore E.K, Ketelbey J.W. The prevalence of Chlamydia trachomatis in a young, sexually-active population. *Med J Aust.* 1987 Dec 7-21;147(11-12):550-2.
61. Kúdelová M, Krivos V, Raslová H, Belvončíková P, Matis J. Occurrence of human papillomavirus 16 and 18 smears from the two cervix regions of onco-gynecological patients in Slovakia. 2008;52(1):17-22.
62. Laimins L.A. Human papillomaviruses target differentiating epithelia for virion production and malignant conversion. *Seminars in Virology.* 1996; 97: 305-313.
63. Lee V, Tobin J.M, Foley E. Relationship of cervical ectopy to Chlamydia infection in young women. *J Fam Plann Reprod Health Care.* 2006; 32: 104-106.
64. Leszczyńska-Gorzela B, Darmochwał-Kolarz D, Borowiec-Blinowska A, Oleszczuk J. The prevalence of Chlamydia trachomatis infection in pregnant women. *Med Wieku Rozwoj.* 2005; 9(1): 27-35.
65. Liu S. S, Tsang P.C.K, Cheung A.N.Y, Chan K.K.L, Leung R.C.Y, Ngan H.Y.S. Distribution of six oncogenic types of human papillomavirus and type 16 integration analysis in Chinese women with cervical precancerous lesions and carcinomas. *Tumor Biol.* 2008. 29:105-113.
66. Longworth M.S, Laimins L.A. Pathogenesis of human papillomavirus in differentiating epithelia. *Microbiology And Molecular Biology Reviews.* 2004; 68 (2):362-372.
67. Louv W.C, Austin H, Perlman J, Alexander W.J. Oral contraceptive use and the risk of chlamydial and gonococcal infections. *Am J Obstet Gynecol.* 1989 Feb;160(2):396-402.
68. Machado L.C, Whitaker A.S, Barbabosa H. Evidence for benefits from treating cervical ectopy: literature review. *Sao Paulo Med. J.* 2008; 126(2):1332-139.

69. Mallison H, Arya O.P, Goddard A.D. Quantitative study of Chlamydia trachomatis in genital infection. *Br J Vener Dis.* 1982;58(1):36-9.
70. Marisco C, Kimberlin D.W. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital J Pediatr.* 2017; 43(1):38.
71. Mati J.K, Hunter D.J, Maggwa B.N, Tukei P.M. Contraceptive use and the risk of HIV infection in Nairobi, Kenya. *Int J Gynaecol Obstet.* 1995;48(1):61-7.
72. Mayer K.H, Anderson D.J. Heterosexual HIV transmission. *Infect Agents Dis.* 1995;4(4):273-84.
73. Medej J, Basta A, Madej J.G, Strama M. Współczesny model postępowania w przypadkach erytroplakii. (Contemporary model for treatment of erythroplakia). *Przegl Lek.* 1999; 56(1):5-13.
74. Mena O, Herrera A, Pérez Y, Colmenares O. Infección múltiple por genotipos del virus del papilloma humano en pacientes que acuden a consulta privada del municipio de Naguanagua. *Slus.* 2015. 19(3): 14-19.
75. Miotti P, Canner J, Chipangwi J, Liomba G, Saah A, Dallabetta G. Preparations for AIDS vaccine evaluations. Rate of new HIV infection in a cohort of women of childbearing age in Malawi. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994;10 (S2):S239-41.
76. Moscicki AB, Ma Y, Holland C, Vermund SH. Cervical ectopy in adolescent girls with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 2001;183(6): 865-70. Monif G.R.G. Infectious diseases in obstetrics and gynecology. 2a ed. Philadelphia. Editorial Harper & Row. 1982.
77. Moody C.A, Laimins L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer.* 2010; 10: 550-560.
78. Moreira M.A, Mussiello R, Rivorire W.A. Cauterização do colo uterino : quando e como usar?. (Uterus cautery: when and how to use it?). *Femina.* 1990;18(4):289-91.
79. Morrison C.S, Bright P, Wong E.L, Kwok C, Yacobson I, Gaydos CA, Tucker H.T, Blumenthal P.D. Hormonal contraceptive use, cervical ectopy, and the acquisition of cervical infections. *Sex Transm Dis.* 2004; 31(9):561- 7.
80. Moscicki A.B, Ma Y, Holland C, Vermund S.H. Cervical ectopy in adolescent girls with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 2001;183(6): 865-70.
81. Moss G.B, Clemetson D, D'Costa L. Association of cervical ectopy with heterosexual transmission of human immunodeficiency virus: results of a study of couples in Nairobi, Kenya. *J Infect Dis.* 1991;164(3):588-91.
82. Muñoz N, Bosch F.X, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K, Snijders P.F, Meijer C. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine.* 2003; 348 (6): 518-527.
83. Myer L, Wright T.C, Denny L, Khun L. Nested case-control study of cervical mucosal lesions, ectopy, and incident HIV infection among women in Cape Town, South Africa. *Sexually Transmitted Diseases.* 2006; 33 (11):683-687.

84. Nicolosi A, Correa LML, Musicco M, Arici C, Gavazzeni G, Lazzarin A. The efficiency of male-to-female and female-to-male sexual transmission of the human immunodeficiency virus: a study of 730 stable couples. Italian Study Group on HIV Heterosexual Transmission. *Epidemiology* 1994; 5:570 –575.
85. Orozco-Colín A, Carrillo-García A, Méndez-Tenorio A, Ponce de León S, Mohar A, Rodríguez-Maldonado R, Guerra-Arias R, Flores-Gil O, Lizano M. Geographical variation in Human Papillomavirus prevalence in Women with Normal Cytology within the Mexican Population. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010. 14:e1082-e1087.
86. Paavonen J, Vesterinen E. Chlamydia trachomatis in cervicitis and urethritis in women. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1982;32:45-54.
87. Pacheco J. Infección por Chlamydia trachomatis. *Ginecología y obstetrician*. 1999; 45(3):159-66.
88. Park S.C, Jeon Y.M, Jeon Y.T. Approach to Cytomegalovirus infections in patients with ulcerative colitis. *Korean J Intern Med* 2017; 32(3):383-392.
89. Peulescu P, Dincă A, Fîncu A. Chlamydia trachomatis infection of the genitals in women. *Rev Roum Virol*. 1993;44(3-4): 237-42.
90. Pirog E.C, Kleter B, Olgac S, Bobkiewics P, Linderman J, Quint W.G.V, Richart R.M, Isacson C. Short Communication. Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *American Journal of Pathology*. 2000. 157 (4): 1055-1062.
91. Plourde P.J, Plummer F.A, Pepin J, et al. HIV-1 infection in women attending an African sexually transmitted disease clinic: association with genital ulcer disease and with oral contraceptive use. *J Infect Dis*. 1992; 166(1): 86-92.
92. Plourde .PJ, Pepin J, Agoki E, et al. Human immunodeficiency virus type 1 seroconversion in women with genital ulcers. *J Infect Dis*. 1994;170(2):313-7.
93. Plummer F.A, Chubb H, Simonsen J.N, Bosire M, Stanley L, Maclean I, Ndinya-Achola J.O, Waiyaki P, Brunham R.C. Antibody to Rmp (Outer Membrane Protein 3) increases susceptibility to Gonococcal infection. *J Clin Invest*. 1993 Jan;91(1):339-43.
94. Pryse-Davies J. Paediatric and adolescent gynaecology. *Clin Obstet Gyneacol* 1974;1(3):483-508.
95. Quinn T.C. The epidemiology of the acquired immunodeficiency syndrome in the 1990s. *Emerg Med Clin North Am*. 1995;13(1):1-25.
96. Quinn T.C, Gaydos C, Shepherd M, Bobo L, Hook E.W 3rd, Viscidi R, Rompalo A. Epidemiologic and microbiologic correlates of Chlamydia trachomatis infection in sexual partnerships. *JAMA*. 1996 ;276(21): 1737-42.
97. Rahm V.A, Odland V, Gnarpe H. Chlamydia trachomatis among sexually active teenage girls: influence of sampling location and clinical signs on the detection rate. *Genitourin Med*. 1990;66(2):66-9.

98. Rahm V.A, Od lind V, Pettersson R. Chlamydia trachomatis in sexually active teenage girls. Factors related to genital chlamydial infection: a prospective study. *Genitourin Med.* 1991;67(4):317-21.
99. Ripa K.T, Svensson L, Mårdh P.A, Weström L. Chlamydia trachomatis cervicitis in gynecologic outpatients. *Obstet Gynecol.* 1978;52(6):698-702.
100. Rocha-Zavaleta L, Yescas G, Cruz R.M, Cruz-Talonia F. Human papillomavirus and cervical ectopy. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2004. 85: 259-266.
101. Ross M.H, Kaye G.I, Pawlina W. *Histología. Texto y Atlas. Color con biología celular y molecular.* 4ª edición. Médica Panamericana. 2004. Buenos Aires, Argentina.
102. Ruggao S, Nagachinta T, Wanapirak C, Srisomboon J, Suriyanon V, Sirirojn B, Chaiyarassamee O, Prasertwitayakij W, Celentano D.D, Nelson K.E, Vernon S.D, Duerr A. Gynecological conditions associated with HIV infection in women who are partners of HIV-positive Thai blood donors. *Int J STD AIDS.* 1998; 9:677-82.
103. Sahu B, Latheef R, Aboel Maqd S. Prevalence of phetology in women attending colposcopy for postcoital bleeding with negative cytology. *Arch Gynecol Obstet.* 2007; 276(5):471-3
104. Sánchez-Rodríguez W. Química Clínica del moco cervical. <http://es.scribd.com/doc/8705364/Qc-Examen-Del-Moco-Cervical>
105. Sánchez SE, Koutsky LA, Sánchez J, Fernández A, Casquero J, Kreiss J, Catlin M, Xia M, Holmes KK. Rapid and inexpensive approaches to managing abnormal vaginal discharge or lower abdominal pain: an evaluation in women attending gynaecology and family planning clinics in Peru. *Sex Transm Infect.* 1998; 74 Suppl 1: S85-94.
106. Sankaranarayanan R. and Ramani S. Wesley. *Manual práctico para la detección de las neoplasias cervicales.* 2004. <http://creening.iarc.fr/viavili.php?lang=3>
107. Sarkar K, Bal B, Mukherjee R, Saha MK, Chakraborty S, Niyogi SK, Bhattacharya SK. Young age is a risk factor for HIV among female sex workers--an experience from India. *J Infect.* 2006;53(4):255-9.
108. Sedlecki K., Markovic M., Rajic G. Risk factors for Chlamydia infections of the genital organs in adolescent females. *Srp Arh Celok Lek.* 2001; 129(7-8):169-74.
109. Sellors J.W. and Sankaranarayanan R. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepithelial cervical. *Manual para principiantes.* 2003. <http://screening.iarc.fr/colpo.php?lang=3>
110. Shafer M.A, Pessione F, Scieux C, Bianchi A, Casin M, Athéa N, Vexiau D, Kermanach M, Spira A, Perol Y, et al. Chlamydia trachomatis: risk factors in women in the Parisian region. Importance of smoking and cervical ectropion. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 1993;22(2):163-8.
111. Si- Mohamed A, Ndjoyi-Mbiguino A, Cuschieri K, Onas I.N, Colombet I, Ozouaki F, Goff J.L, Cubie H, Bélec L. High prevalence of high-risk oncogenic human

- papillomaviruses harbouring atypical distribution in womwn of childbearing age living in Libreville, Gabon. *J Med Virol*. 2005. 77(3): 430-438.
112. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nestedmultiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42:3176-3184.
 113. Stergachis A, Scholes D, Heidrich FE, Sherer DM, Holmes KK, Stamm WE. Selective screening for Chlamydia trachomatis infection in a primary care population of women. *Am J Epidemiol*. 1993; 138(3): 143-53.
 114. Tait IA, Rees E, Hobson D, Byng RE, Tweedie MC. Chlamydial infection of the cervix in contacts of men with nongonococcal urethritis. *Br J Vener Dis*. 1980;56(1):37-45.
 115. Tanton C, Weiss HA, Le Goff J, Changaducha J, Rusizoka M, Baisley K, Everett D, Ross DA, Belec L, Hayes Rj, Watson-Jones D. Correlates of HIV-1 Genital Shedding in Tanzanian Women. *Plos One*. 2011;6 (3):e17480.
 116. Tawfik El-Mansi m, Cuschieri KS, Morris RG, Williams AR. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma and its precursors in Scottish patients. *Int J Gynecol Cancer* 2006. 16: 1025-31.
 117. Toon PG, Arrand JR, Wilson LP, Sharp DS. Human papillomavirus infection in the uterine cervix of women without cytological signs of neoplasia.
 118. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, Buonaguro L, Bounaguro FM. Human papillomavirus (VPH) genotypes and HPV-16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology*. 2010.
 119. Vaccarella S, Franceschi S, Snijders P. J. F, Herrero R, Meijer C. J, Plummer M, and the IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: pooled analysis of the IARC HPV prevalence Survey. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19(2):503-10.
 120. Wood PL, Hobson D, Rees E. Genital infections with Chlamydia trachomatis in women attending an antenatal clinic. *Br J Obstet Gynaecol*. 1984 Dec;91(12):1171-6.
 121. Xue Y, An R, Zhang D, Zhao J, Wang X, Yang L, He D. Detection of surviving expression in cervical cancer cells using molecular beacon imaging: new strategy for the diagnosis of cervical cancer. *European journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011. 159: 204-208.
 122. Zbroch T, Knapp P, Błońska E, Kobylec M, Knapp P. Life style, Chlamydia trachomatis infection, bacterial vaginosis and their impact on the frequency of cervical lesions. *Ginekol Pol*. 2004; 75(7): 538-44.
 123. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 2006; 11:2286-2302.
 124. Zuñiga M. Neisseria gonorrhoeae: A pathogen posing major challenges. *Revista Colombiana de Enfermería* . 2009;5(5):67-70.

125. <http://unaids.org/es/resources/presscentre/pressreleaseandstatementarchive/2012/November/20121120prresults/>
126. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000602.htm>
127. <http://www.aids.gov/hiv-aids-basics/hiv-aids-101>
128. [globocan.iarc.fr/Pages/facts sheets population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/facts_sheets_population.aspx)

12. Anexos

Proteínasa K (16.5 mg/ml)

Tris HCl	100 mM pH 8.0
NaCl	100 mM
EDTA	25 mM pH 8.0
SDS	0.5 %

Buffer de digestión para Proteínasa K

Proteínasa K	165 mg
Tris HCl	10 mM pH 7.5
CaCl ₂	20 mM
Glicerol	50 %

PBS 1X

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ PO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Diluir en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1L.

TBE 5X

Tris-Base	27.25 g
Ácido Bórico	13.9 g
EDTA	1.85 g

Diluir en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 1L.

Tabla de resultados del grupo Eversión Glandular

		MY09/MY11	L1C1/L1C2	PR3/PR4	18F/18R		Coktail 1	Coktail 2	Coktail 3	Coktail 4		LCR	E6	E7
3 EG	+	-	+			18					18			
7 EG	+	+			+						18			
9 EG	+	-	+	-	-	18				66	18/66			
14 EG	+	-	-											
18 EG	-													
20 EG	+	+		-	+								-	-
22 EG	-													
33 EG	-													
35 EG	+	+		-	-	18			43		18/43			
38 EG	+	-	-											
39 EG	+	-	-											
42 EG	+	+		-	+		16				18/16			
45 EG	+	+		-	-	18					18			
46 EG	+	-	+	-	-						+			
47 EG	+	+		-	+					66	18/66			
48 EG	+	+		-	+						18			
52 EG	+	+		-	-	18					18			
58 EG	+	+		-	-	18			43	66	18/43/66			
59 EG	+	-	+	-	-				43	51	43/51			
65 EG	+	-	-											
72 EG	+	-	-											
73 EG	+	+		-	+		18			51	18/51	+	+	
75 EG	+	+		-	+						18			+

Muestra	β Globina	VPH	L1C1/L1C2	VPH-16 PR3/PR4	VPH-18 18F/18R	Secuenciación	PCR Múltiple	Andada	Tipo viral	Corroboración VPH-18	E6	E7
		MY09/MY11					Coktail 1	Coktail 2	Coktail 3	Coktail 4	LCR	
81 EG	+	+		-	-				43			
85 EG	+	-										
86 EG	+	-	+	-	-	18						
90 EG	+	-	+	-	-	18	52		66	18/52/66	-	-
93 EG	+	-	+	-	-	18				18	-	-
95 EG	+	-	+	-	-	18				18	-	-
96 EG	+	-	+	-	-			43		43		
98 EG	+	-	+	-	-	18	6/11			18/6/11	-	-
100 EG	+	-	+	-	-	18				18	-	-
101 EG	+	-	+	-	-					+		
102 EG	+	-	+	-	-	18				18	-	-
104 EG	+	-	-									+
105 EG	+	-	+	-	-			43		43		
106 EG	+	-	+	-	-					+		
110 EG	+	-	+	-	-			43		43		
112 EG	+	-	+	-	-			43		43		
122 EG	+	-	-									
123 EG	+	-	+	-	-	18				18	-	-
127 EG	+	-	+	-	-	18				18	-	-
128 EG	+	-	+	-	-	18				18	-	-
132 EG	+	-	+	-	-	18				18	-	-
134 EG	+	-	-									+
135 EG	+	-	+	-	-	18				18	-	-

Muestra	β Globina	VPH		VPH-16	VPH-18	Secuenciación	PCR Múltiple	Anidada				Tipo viral	Corroboración VPH-18		
		MY09/MY11	L1C1/L1C2	PR3/PR4	18F/18R		Coktail 1	Coktail 2	Coktail 3	Coktail 4		LCR	E6	E7	
143 EG	-														
148 EG	+	+		-	-	18						18	-	-	+
149 EG	+	+		-	-	18						18	-	-	+
150 EG	+	+		-	+							18	-	-	+
154 EG	+	+		-	-	18		56				18/56	-	-	+
155 EG	+	+		+	-							16			
157 EG	+	+		-	-	18						18	-	-	+
158 EG	+	+		-	-	18						18	-	-	+
168 EG	+	+		+	+		6/11					18/16/6/11	-	-	+
169 EG	-														
170 EG	-														
171 EG	+	-		-	-	18						18	-	-	+
172 EG	+	-		-	-							+			
173 EG	-														
174 EG	+	-		-	-							+			
175 EG	+	-		-	-	18		52				18/52	-	-	+
176 EG	+	-		-	-	97						97			
177 EG	+	-		-	-							+			
178 EG	-														
179 EG	+	+		-	+							18	-	-	+
180 EG	+	-		-	-							+			
181 EG	+	+		+	+							18/16	-	-	+
182 EG	+	-		-	-							+			

Muestra	β Globina	VPH		VPH-16	VPH-18	Secuenciación	PCR Múltiple	Anidada				Tipo viral	Corroboración VPH-18		
		MY09/MY11	L1C1/L1C2	PR3/PR4	18F/18R		Coktail 1	Coktail 2	Coktail 3	Coktail 4		LCR	E6	E7	
183 EG	-														
184 EG	+	-	+	-	-										
185 EG	+	+		+	+										
186 EG	+	+		-	-	18									
187 EG	-														
188 EG	+	+		-	+										
189 EG	+	+		-	+										
190 EG	+	-	+	-	-	18									
191 EG	-														
192 EG	+	-	+	-	-										
193 EG	+	+		-	+										
194 EG	+	+		-	-	18									
195 EG	+	+		-	-										
196 EG	+	-	+	-	-										
197 EG	+	-	+	-	-	18									
198 EG	+	-	+	-	-	18									
199 EG	+	+		-	-	18									
200 EG	+	+		-	-	18									
201 EG	+	+		-	-	18									
202 EG	+	+		-	-										
203 EG	+	+		-	+										
204 EG	+	-	-												
205 EG	+	+		-	+										

Muestra	β Globina	VPH	VP16	VP18	Secuenciación	PCR Múltiple	Anidada				Tipo viral	Corroboración VPH-18		
		MY09/MY11	PR3/PR4	18F/18R		Coktail 1	Coktail 2	Coktail 3	Coktail 4		LCR	E6	E7	
206 EG	+	+	-	-	18						18	-	-	+
207 EG	+	+	-	+							18			
208 EG	+	+	-	-	18						18	-	-	+
209 EG	+	+	+	+							18/16			
210 EG	+	+	+	-	18		42				18/42	-	-	-
211 EG	+	+	-	-	18						18			
212 EG	+	+	-	+							18	-	-	+
213 EG	+	+	-	-	18						18	-	-	+
214 EG	+	+	-	-	16						16			
215 EG	+	+	-	+							18	+	+	+
216 EG	+	+	-	-	16						16			
217 EG	+	+	-	+							18	-	-	+
218 EG	+	+	-	-	16						16			
219 EG	+	+	-	-	18						18	-	-	+
220 EG	+	+	-	-	18						18			
221 EG	+	+	-	-	18						18	-	-	+
222 EG	+	+	-	-	18						18	-	-	+
223 EG	+	+	-	-	18		42				18/42	-	-	+
224 EG	+	+	-	-	18						18	-	-	+
225 EG	+	+	-	-	18						18	-	-	+



Prevalence of human papillomavirus genotypes, and mucosal IgA anti-viral responses in women with cervical ectopy

Olga L. Monroy^a, Cecilia Aguilar^a, Marcela Lizano^a, Fernando Cruz-Talonia^b, Rosa M. Cruz^b, Leticia Rocha-Zavaleta^{a,*}

^a Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, México D.F., C.P. 04510, México

^b Fundación Cruz Talonia, Colegio Mexicano de Colposcopistas, México D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2009

Received in revised form

29 September 2009

Accepted 7 October 2009

Keywords:

Human papillomavirus infection

Cervical ectopy

Human papillomavirus prevalence

Endocervical cells

ABSTRACT

Background: Data on the prevalence of different human papillomavirus (HPV) genotypes and the associated mucosal immune response in women with cervical ectopy are scarce.

Objective: To assess the prevalence of different HPV genotypes and the mucosal anti-viral immune response in cervical ectopy.

Study design: Detection and typing of HPV DNA was determined in 141 women with cervical ectopy, 272 cytologically normal controls and 98 low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) by PCR and direct sequencing. Mucosal IgA antibodies to HPV16 and HPV18 were evaluated in cervical mucus by ELISA.

Results: The prevalence of HPV in cervical ectopy was higher (73.7%) than that observed in control samples (30.5% in endocervix, and 1.8% in exocervix), but similar to the prevalence in LSIL (62.2%). Typing showed that the overall distribution frequency concerned 14 different genotypes, with HPV18 being the most prevalent in cervical ectopy (53.9%), whereas HPV16 predominated in LSIL (38.7%). High-risk HPV genotypes were 2.2 times more frequent in cervical ectopy than in the normal endocervix ($p < 0.0001$). HPV infection in cervical ectopy patients was accompanied by a mucosal IgA-antibody response. Antibody reactivity to HPV18 was significantly higher than the response to HPV16.

Conclusion: Cervical ectopy is a risk factor for infection with high-risk HPV genotypes, in particular HPV18. Our results emphasize the need of further studies to clarify the oncogenic potential of this virus in cervical ectopy.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

Infection with high-risk human papillomavirus (HPV) genotypes is associated with most cases of cervical tumors.¹ HPV types 16 (HPV16) and 18 (HPV18) are the most prevalent types found in cervical cancer. HPV16 is associated with infection of the squamous epithelium, and the progression to squamous cervical carcinoma.² In contrast, HPV18 is commonly associated with cervical adenocarcinomas³ and glandular lesions,⁴ suggesting that HPV18 has a greater tropism for cervical glandular tissue.⁵

Glandular epithelium lines the surface of the cervical canal (endocervix), and is composed of a single layer of mucin-secreting

columnar cells that form cleft-like infoldings with a glandular appearance. During pregnancy and in adolescence the columnar cells of the endocervix extend beyond the external os onto the vaginal surface. This physiological process is called cervical ectopy, and it can also be induced by the intake of hormonal contraceptives. Although most women are asymptomatic, the condition can present with irregular discharge and postcoital and intermenstrual bleeding.^{6,7} It has been suggested that cervical ectopy may be a potential risk factor for various sexually transmitted diseases, including *Chlamydia trachomatis*,⁸ HIV,⁹ and HPV infection.^{10–12} In a previous work we showed that the detection of HPV DNA was more common in cervical ectopy than in cytology normal controls.¹² However, the prevalence of different HPV genotypes in cervical ectopy is yet unknown.

Humoral immunity in the female genital tract has been well characterised. It is known that IgA- and IgG-secreting plasma cells are abundant in the lamina propria of endocervix. However, little is known about the antibody-mediated immune response in women with cervical ectopy.¹²

The purpose of the present study was to define the prevalence of HPV genotypes in cervical ectopy. In addition, the presence of a

Abbreviations: HPV, human papillomavirus; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; PCR, polymerase chain reaction; HIV, human immunodeficiency virus; IgA, immunoglobulin A; IgG, immunoglobulin G; VLP, virus-like particle; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PRR, prevalence rate ratio; CI, confidence interval.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56229217; fax: +52 55 56229212.

E-mail address: lrochaz@correo.biomedicas.unam.mx (L. Rocha-Zavaleta).

mucosal antibody-mediated response to the virus in cervical ectopy was determined.

2. Objective

To assess the prevalence of different HPV genotypes, and the mucosal anti-viral immune response in patients with cervical ectopy.

3. Study design

3.1. Subjects and samples

The study population was selected from women attending the Clinic of Dysplasias of the Mexican College of Colposcopists, Mexico City. This clinic provides gynecological services to women referred for colposcopy because of either abnormal cytology or gynecological symptoms, and women without a history of cervical abnormalities who ask for a routine examination. In the present study, 511 women who consented to participate and provide data related to additional risk factors for cervical cancer were included. All women underwent cytological and histopathological analysis. Colposcopy-directed biopsies from 141 women with confirmed cervical ectopy, and 98 patients with low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) were studied. All cervical ectopy cases complained of abnormal vaginal discharged and/or post-coital bleeding. Two independent, age-matched control groups were formed. From 272 subjects without a history of HPV infection, and no evidence of cervical abnormalities we obtained 105 exocervical biopsies (“normal exocervix” group) and 167 endocervical cell samples using a standard cytobrush (“normal endocervix” group). Consecutive exocervical biopsies were collected until the “normal exocervix” group was integrated. Afterwards, endocervical samples were consecutively obtained to constitute the “normal endocervix” group. Cervical mucus was collected by washing the uterine cervix with 1 mL of sterile, contaminant-free phosphate-buffered saline (PBS) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Cell debris was eliminated by centrifugation at 13,000 rpm for 5 min and supernatant collected for analysis. Mucus samples were subsequently stored at -70°C until tested.

3.2. HPV DNA detection

DNA was extracted and purified using the QIAamp DNA Micro kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) according to the protocol of the manufacturer. HPV DNA was amplified using the general primers MY09-MY11,¹³ which amplify a conserved 450-bp fragment from the L1 gene, and the L1C1-L1C2-1 consensus primers which amplify a 250-bp fragment of the L1 gene located upstream of the MY sequence.¹⁴ The PCR protocol was: 95°C for 5 min, 30 cycles of 45°C (for MY09-MY11) or 49°C (for L1C1-L1C2-1) for 30 s, and 72°C for 60 s. PCR products were analysed by using agarose gel electrophoresis. An internal control β -globin gene fragment was co-amplified using the PC03 and PC04 primers as described elsewhere.¹⁵ DNA from SiHa cells, containing 1–2 HPV16 copies per cell, was used as a positive control.

3.3. HPV typing

HPV genotypes were determined by two separate protocols; one using type-specific primers for HPV16 and HPV18, and the other using general HPV (MY09-MY11) primers followed by dideoxynucleotide sequencing. Specific amplification of HPV16 was achieved by using the Pr3-Pr4 primers that amplify a 499 fragment covering the HPV16-E7 gene plus fragments of the E6 and E1 genes.¹⁶ Detec-

tion of HPV18 was accomplished by using the HPVE718F (5'-AAG AAA ACG ATG AAA TAG ATG-3'), and HPVE718R (5'-GGC TTC ACA CTT ACA ACA CA-3') primers that amplify a 100 bp fragment of the HPV18-E7 gene. The PCR protocol was: 5 min at 95°C , 38 cycles of 94°C for 30 s, 54°C (for HPV16) or 53°C (for HPV18) for 60 s, and 72°C for 90 s, followed by 10 min at 72°C . Agarose electrophoresis was then performed. DNA from SiHa (HPV16 positive cell line) and HeLa (HPV18 positive cell line) cells were included as positive controls.

HPV genotypes were also identified by direct sequencing of positive MY09-MY11 PCR products. PCR products were purified with Exo-SAP-IT (USB Corp., Cleveland, OH), and subjected to cycle sequencing with an ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), using MY11 as the sequencing primer. The reaction mixture was analysed in the ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequence alignments were performed against standard HPV genotypes available in GenBank using a BLAST server. HPV genotypes were identified on the basis of more than 98% sequence homology considering 350 nucleotides.

3.4. E6/E7 nested multiplex PCR

Multiple HPV infections were investigated by using a nested multiplex PCR based on the use of type-specific nested PCR primers that amplify the E6/E7 region as described elsewhere.¹⁷ Briefly, DNA samples were subjected to a first-round amplification using the consensus forward GP-E6-3F (5'-GGG W GK KAC TGA AAT CCG T-3'), and reverse GP-E7-5B (5'-CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA-3') and GP-E76B (5'-TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC-3') primers to generate an amplicon ranging from 602 to 666 bp in size. The PCR protocol was: 10 min at 94°C , then 40 cycles of 94°C for 60 s, 40°C for 60 s, 72°C for 120 s, followed by 10 min at 72°C . GP-E6/E7 PCR products were subsequently amplified with type-specific nested primers arranged in four cocktails for the following HPV genotypes: cocktail I (HPV16, 18, 31, 59, 45), cocktail II (HPV33, 6/11, 58, 52, 56), cocktail III (HPV35, 42, 43, 44), and cocktail IV (HPV68, 39, 51, 66). The PCR protocol was: 10 min at 94°C , then 38 cycles of 94°C for 30 s, 56°C (for cocktails I and II) or 54°C (for cocktail III) or 50°C (for cocktail IV) for 30 s, 72°C for 45 s, followed by 10 min at 72°C . The identification of each HPV genotype was achieved by evaluating the size of the specific PCR product by agarose gel electrophoresis as described previously.¹⁷

3.5. Immunoassay for the detection of mucosal anti-HPV antibodies

HPV16 or HPV18 virus-like particles (VLP) were kindly donated by Dr. Martin Sapp (Feist Weiller Cancer Center, and Center for Tumor Virology, LSU Health Sciences Center, USA) and used as target antigen in a standard ELISA. Total protein content of mucus samples was determined using Protein Assay kit (Bio-Rad Lab., Hercules, CA). ELISA MaxiSorp plates (Nunc, Rochester, NY) were coated with 500 ng/well VLP diluted in PBS, at 4°C overnight. Plates were washed and non-specific binding sites were blocked with 2% BSA for 2 h at 37°C . After washing, 100 μL of cervical mucus diluted at a protein concentration of 100 μg protein/ μL were added to the plate and incubated for 2 h at 37°C . After washing, 100 μL of alkaline phosphatase-conjugated rabbit-anti human IgA (Dako Co., Carpinteria, CA), diluted 1:500 were added, and incubated for 1.5 h at 37°C . After washing, alkaline phosphatase substrate Sigma 104 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) was diluted in a 10% (w/v) diethanolamine solution, and added to the plates. The absorbance was read at 405 nm in an ELISA plate reader. All samples were tested in three wells, the assay was considered valid only when the coefficient of variation of the triplicates was $\leq 10\%$. Addition-

Table 1
Evaluation of risk factors for genital HPV infection.

	Normal control (n = 272)	Cervical ectopy (n = 141)	LSIL (n = 98)	p-Value ^a
Mean age (range)	33.3 (17–51)	28.9 (15–49)	29.1 (16–50)	ns
Mean number of sexual partners	1.7	1.6	2.3	ns
Mean age at first intercourse	18.9	18.2	18.3	ns
Mean number of pregnancies	2.4	1.8	2.0	ns
Use of hormonal contraceptives ^b (%)	7.6	17.1	11.5	0.01

Values showing a significant difference ($p < 0.05$) are shown in bold. LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion. ns: not significant.

^a p-Values were determined by Student's *t*-test. Significance was calculated using the normal control group as reference value.

^b Includes patches, oral, and injectable contraceptives.

ally, all samples were tested on two wells not coated with antigen to define non-specific reactivity. The final ELISA value was calculated by subtracting the non-specific reactivity mean absorbance from the mean absorbance of the triplicates.

3.6. Statistical analysis

The prevalence rate ratios (PRR) were calculated using the equation: prevalence of HPV infection in the cervical ectopy group/prevalence of HPV infection in the normal endocervix group. Fisher's exact test was used to evaluate the differences between the proportions of positive outcomes among groups. The Student's *t*-test was used to compare the mean signal strength (absorbance) of the various groups, and for comparison of the risk factors. All tests were two-tailed and considered a basic significance level of $p = 0.05$.

4. Results

4.1. Detection of HPV infection

Samples from 511 women were studied. No statistically significant differences in age, mean age at first intercourse, number of lifetime sexual partners, and number of pregnancies were observed between the study groups. A higher proportion of women with cervical ectopy declared to use hormonal contraceptive methods as compared with the normal controls (Table 1). However, among cervical ectopy cases the proportion of HPV DNA-positive women was statistically similar between contraceptive users and non-users ($p = 0.7$).

HPV DNA was detected in 104 (73.7%) cervical ectopy cases, compared with 32 (30.4%) normal endocervix, and 3 (1.8%) nor-

mal exocervix controls. The proportion of HPV infection in cervical ectopy was significantly higher than that observed in both the exocervical and endocervical control groups ($p < 0.0001$) (Table 2). The frequency of HPV infection in cervical ectopy was similar to that observed in LSIL cases (62.2%) ($p = 0.6$).

4.2. Prevalence of different HPV genotypes

Genotyping showed the presence of low-risk HPV6/11, 42, and 43 genotypes, high-risk HPV16, 18, 31, 51, 52, 53, 56, 58, and 66 genotypes, and HPV types of unknown risk 90, and 97 (Table 2). HPV16 and HPV18 were the most prevalent genotypes among positive samples. HPV18 was the most prevalent type in cervical ectopy, and it was 12.6 times more frequent than HPV16. Low-risk HPV11, 42, and 43 were found in 2, 4, and 6 cervical ectopy patients, respectively. HPV97 was found in a single cervical ectopy sample. The prevalence of HPV18 was significantly higher in cervical ectopy than in any other group. The occurrence of HPV16 was similar between cervical ectopy and the normal endocervix group ($p > 0.05$). However, HPV16 was more prevalent in LSIL cases ($p < 0.0001$). Infections with multiple HPV genotypes were detected in a small proportion of cervical ectopy (11.3%) and LSIL (15.3%) cases (Table 3). Co-infection with HPV types 16 and 18 was observed in 2.8% of cervical ectopy and 14.3% of LSIL samples. Triple infections were found in only two cervical ectopy cases.

Statistical analysis of the HPV prevalence in cervical ectopy is shown in Table 4. HPV infection, as determined by universal primers-PCR was 2.4 times more frequent in cervical ectopy than in the normal endocervix ($p < 0.0001$). Similar results were observed for the infection with high-risk HPV genotypes, and for infection with HPV18. In all cases PRR values were higher than 2.

Table 2
Frequencies of the HPV genotypes detected in cervical ectopy, LSIL, and normal cervix.^a

HPV genotype	Cervical ectopy (n = 141) no. (%)	LSIL (n = 98) no. (%)	Normal endocervix (n = 105) no. (%)	Normal exocervix (n = 167) no. (%)
Low risk				
6/11	2(1.4)	1(1.0)	0	0
42	4(2.8)	0	0	0
43	6(4.2)	0	0	0
High risk				
16	6(4.2)	38(38.7)	1(0.9)	2(1.2)
18	76(53.9)	19(19.3)	23(21.9)	1(0.6)
31	0	0	2(1.9)	0
51	2(1.4)	2(2.0)	0	0
52	2(1.4)	0	0	0
53	0	0	1(0.9)	0
56	1(0.7)	0	0	0
58	0	0	1(0.9)	0
66	4(2.8)	1(1.0)	2(1.9)	0
Unknown				
90	0	0	1(0.9)	0
97	1(0.7)	0	1(0.9)	0

LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion.

^a Frequencies indicated include the presence of genotypes both in single and multiple infections.

Table 3
Frequencies of the multiple HPV genotypes infections in cervical ectopy, LSIL, normal endocervix and normal exocervix.

HPV genotypes	Cervical ectopy (n = 141) no.	LSIL (n = 98) no.	Normal endocervix (n = 105) no.	Normal exocervix (n = 167) no.
16-18	4	14	0	0
16-42	1	0	0	0
18-6/11	1	0	0	0
18-42	2	0	0	0
18-43	1	0	0	0
18-51	1	1	0	0
18-52	1	0	0	0
18-56	1	0	0	0
43-51	1	0	0	0
43-66	1	0	0	0
16-18-6/11	1	0	0	0
18-52-66	1	0	0	0

LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion.

Table 4
Number, prevalence and prevalence rate ratio (PRR) for HPV infection in cervical ectopy and normal endocervix.

	Any HPV genotype	High-risk HPV genotypes	HPV18	HPV16
Cervical ectopy (%)	104 (73.7)	91 (64.5)	76 (53.9)	6 (4.2)
Normal endocervix (%)	32 (30.5)	30 (28.6)	23 (21.9)	1 (0.9)
PRR (95% CI)	2.4 (1.8–3.2)	2.2 (1.6–3.1)	2.4 (1.7–3.6)	4.6 (0.7–28.1)
Fisher's exact p-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2

CI: confidence interval.

4.3. Mucosal antibody-mediated response to HPV infection

As shown in Fig. 1, mucosal antibodies to HPV16 were detected in both, cervical ectopy and LSIL patients. The mean signal strength for anti-HPV16 antibodies in cervical ectopy was significantly stronger than that observed in normal controls ($p < 0.001$), but significantly weaker than that detected in the LSIL group ($p < 0.0001$).

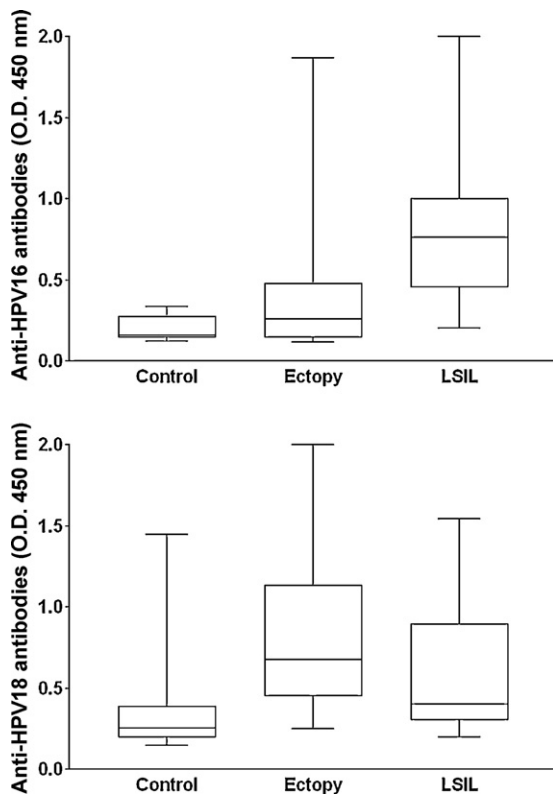


Fig. 1. Analysis of the presence of mucosal antibodies to HPV16 (upper graph), and to HPV18 (lower graph) in cervical mucus from normal controls (control), cervical ectopy patients (ectopy), and low-risk squamous intraepithelial lesion (LSIL) patients.

In contrast, the response to HPV18 in cervical ectopy was clearly stronger than the one detected in patients with LSIL ($p < 0.0001$), and normal controls ($p < 0.0001$).

To investigate whether the detected HPV antibodies correlated with current HPV infection in cervical ectopy, the patients were stratified according to HPV DNA positivity (HPV16 DNA-positive, HPV18 DNA-positive, non-HPV16/18 DNA-positive, and HPV DNA-negative). Mucosal IgA response to HPV16 was significantly higher in cervical ectopy patients infected with the cognate HPV type than that detected in non-infected patients and patients infected with non-HPV16/18 types ($p < 0.0001$) (Fig. 2). The response to HPV18 in HPV18 DNA-positive patients was significantly higher than that observed in HPV DNA-negative women. However, in this case the response in patients infected with the cognate HPV type was not significantly different than that detected in the non-HPV16/18 DNA-positive group ($p = 0.2$).

5. Discussion

Cervical ectopy is thought to increase risk of infection by exposing columnar epithelium to potential agents. In this report we documented a high prevalence of HPV infection in cervical ectopy. This is in agreement with previous reports by various authors, including ourselves.^{10–12} However, in the present work we found that the proportion of HPV infection in cervical ectopy was higher than previously reported. It is important to mention that we previously used the MY09-MY11 PCR for detection of HPV DNA, whereas here DNA was analysed using two different primer sets, MY09-MY11 and L1C1-L1C2-1. It is known that different consensus primer systems have discordant patterns of detection,¹⁸ thus testing human samples with complementary primer sets allows identification of cases that would otherwise remain as false-negatives.¹⁹ In particular, analysis of samples using MY09-MY11 and L1C1-L1C2-1 has been demonstrated to detect a higher proportion of positive samples than when used alone.²⁰

Sequencing revealed the presence of low-risk HPV types 6/11, 42, and 43, high-risk HPV types 16, 18, 31, 51, 52, 53, 56, 58, and 66, and undetermined risk HPV types 90, and 97. In cervical ectopy HPV18 was by far the most common genotype detected (53.9%) followed by HPV16 (4.2%). This is in line with previous reports

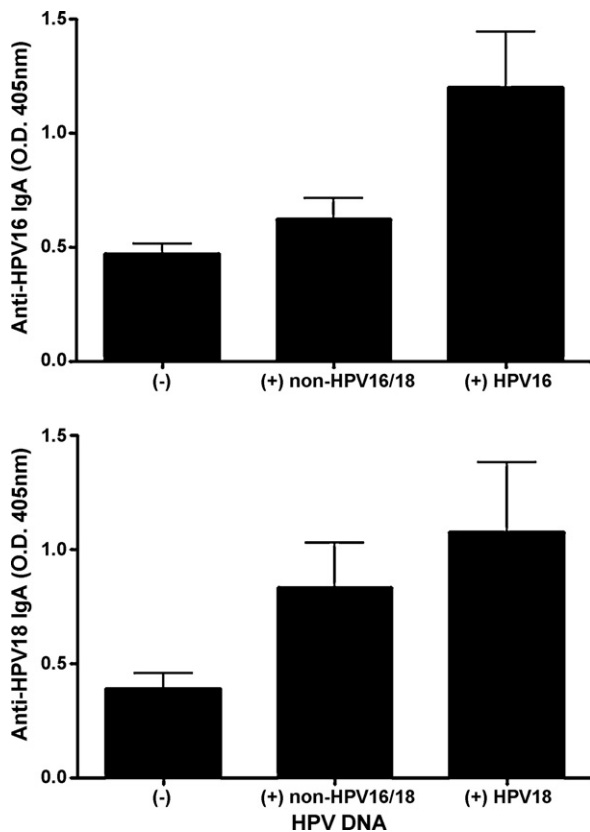


Fig. 2. Analysis of the presence of antibodies in cervical ectopy patients. Cervical mucus samples from cervical ectopy patients who were negative for the presence of HPV DNA (–), infected by non-HPV16/18 genotypes ((+) non-HPV16/18), or infected by HPV16 ((+) HPV16) or HPV18 ((+) HPV18) were tested for the presence of IgA antibodies to HPV16 (upper graph), and HPV18 (lower graph) by ELISA.

showing that HPV18 is strongly associated with glandular lesions of the cervix⁴ and the development of cervical adenocarcinomas.³ However, these results differ from a previous report²¹ showing that HPV types of the $\alpha 9$ species (including HPV16) presented a significantly stronger association with cervical ectopy compared with the association found for HPV types of the $\alpha 7$ species (including HPV18).²¹ This variation is probably due to differences in the specific populations studied and the methods used for cell sampling. In the former report a cohort of randomly selected women from a rural community was analysed. In contrast, we analysed a high-risk population constituted exclusively by hospital patients who were referred for colposcopy because of abnormal vaginal discharge and were diagnosed with cervical ectopy. In the former work exfoliated cervical cells were collected with a cervexbrush (Rovers Medical Devices B.V., Oss, The Netherlands) for cytological studies, followed by a second collection of cells with a Dacron swab to determine the presence of HPV DNA.²² It is very likely that this sampling procedure resulted in the collection of both squamous and columnar cells. Thus, HPV genotypes infecting any of these cellular types may account for the results. On the contrary, in our work cells were obtained from colposcopy-directed biopsies of the exposed columnar epithelium. The presence of glandular epithelium in the specimens was corroborated by histopathology analysis. Inasmuch as separate analysis of endocervical and exocervical cells renders different HPV prevalence values,²³ the collection technique may be critical in the performance and results of HPV testing.

The frequency of high-risk HPV types, in particular HPV18, in cervical ectopy was significantly higher than that observed in normal endocervix. Cervical ectopy is thought to increase risk of infection by exposing columnar epithelium not only to HPV, but

also to other potential pathogens. However, a more likely explanation would involve a complex combination of physical, biological and immunological changes associated with cervical ectopy, and deserves further investigation. It is interesting to note that HPV97 was detected in one cervical ectopy, and one normal endocervical sample. HPV97 was recently determined to be closely related to HPV18,²⁴ but its associated risk for the development of cervical cancer is still undefined. Taken together these observations strongly suggest that cervical ectopy is more susceptible than the normal endocervix for infections by oncogenic HPV genotypes.

Here we observed the presence of HPV DNA in 30.5% of endocervical samples from women with no evidence of cervical abnormalities. Previously reported frequencies range from 0% to 66% depending on the type of sample studied.^{4,23,25–31} The cells used in the present work were retrieved by endocervical brushing. Accordingly, former reports using the same technique documented the presence of HPV DNA in 26–52% normal women.^{29–31} We also found that the prevalence of HPV18 was 23-fold higher than HPV16 in endocervix of normal women, supporting the idea that columnar epithelium is preferentially infected by HPV18.

In this study, the cross-sectional prevalence of HPV18 in endocervix of women with normal cytology was high (21.9%). Indeed, a pooled analysis of women without cytological abnormalities from several regions of Europe, Asia, South America and sub-Saharan Africa showed that the proportion of women infected with HPV18 ranged from 4% to 5%.³² However, samples from Mexico were not included in this study. The prevalence of HPV18 reported for Mexican women with normal cytology ranges from 1% to 2.8%.^{33,34} However, in these studies samples were obtained from the general population,³³ and from women attending a primary health-care centre,³⁴ and HPV detection was performed in DNA isolated from pooled endocervical and exocervical cells. In contrast, we examined endocervical cells from women attending a colposcopy clinic. However, we consider that our results are not conclusive and must be interpreted with caution. Further studies including the analysis of paired endo- and exocervical samples from a larger population will be needed to determine the prevalence of HPV18 in the endocervix of cytologically normal women.

Use of hormonal contraceptive has been associated with cervical ectopy.^{21,35} Accordingly, in the present work we observed that hormonal contraceptive use was significantly more common in cervical ectopy than in LSIL and control women. Interestingly, the prevalence of HPV infection was not associated with hormonal contraceptive use in the cervical ectopy group. Taken together, our results seem to support that hormonal contraceptive use is a risk factor for cervical ectopy, and that cervical ectopy predisposes to HPV infection. From these observations the hypothesis that cervical ectopy may be an intermediate between hormonal contraceptive use and HPV infection can be proposed, at least for this group of women. Nevertheless, it seems clear that long duration use of hormonal contraceptive increases risk of developing cervical cancer,³⁶ but the association of hormonal contraceptive use and the simultaneous detection of HPV in the cervix remains controversial.³⁷

Here we showed that mucosal antibodies to HPV capsids were induced in women with cervical ectopy. Mucosal antibody responses to viral capsids correlate with HPV infection of the squamous epithelium.^{38–40} However, an association of mucosal antibodies with HPV infection in cervical ectopy had not been previously established. Here we observed that the response against HPV16 was predominantly found in HPV16-infected patients. However, response against HPV18 was observed in both HPV18-infected and non-HPV16/18 types-infected patients. Antibody responses against HPV have been demonstrated to be type-specific,⁴¹ but cross-reactive antibodies have also been identified.^{42,43} Besides, due to the high frequency of HPV18 infection in columnar epithe-

lium, the possibility of having detected antibodies elicited during past infections cannot be ruled out.

In summary, our results strongly suggest that cervical ectopy is a risk factor for high-risk HPV infection, and more importantly for HPV18 infection. HPV18 has been associated with the transformation of glandular cervical epithelium. Thus, further studies are needed to clarify a number of issues arising from our observations, such as the persistence of HPV18 during the course of cervical ectopy, the persistence of the virus in newly formed tissue after the occurrence of natural or surgery-induced metaplasia, the role of the immune response during this process, and the oncogenic potential of the virus in the glandular cells of cervical ectopy.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Martin Sapp for kindly providing HPV16 and 18 VLP. This study was funded by the Mexican National Council for Science and Technology (CONACYT) (49167-M) and the National Autonomous University of Mexico PAPIIT (IN210507) grant programmes.

References

- Wallboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; **189**:12–9.
- Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; **97**:1066–71.
- Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer* 2001; **37**:246–50.
- Tawfik El-Mansi M, Cuschieri KS, Morris RG, Williams AR. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma and its precursors in Scottish patients. *Int J Gynecol Cancer* 2006; **16**:1025–31.
- Clifford G, Franceschi S. Members of the human papillomavirus type 18 family (alpha-7 species) share a common association with adenocarcinoma of the cervix. *Int J Cancer* 2008; **122**:1684–5.
- Banchhita S, Rahamatulla L, Aboel M. Prevalence of pathology in women attending colposcopy for postcoital bleeding with negative cytology. *Arch Gynecol Obstet* 2007; **276**:471–3.
- Harry VN, Cruickshank ME, Parkin DE. Auditing the use of colposcopy versus general gynecology clinics to investigate women with postcoital or intermenstrual bleeding: a case for a new outpatient service. *J Low Genit Tract Dis* 2007; **11**:108–11.
- Lee V, Tobin JM, Foley E. Relationship of cervical ectopy to chlamydia infection in young women. *J Fam Plann Reprod Health Care* 2006; **32**:104–6.
- Myer L, Wright Jr TC, Denny L, Kuhn L. Nested case-control study of cervical mucosal lesions, ectopy, and incident HIV infection among women in Cape Town, South Africa. *Sex Transm Dis* 2006; **33**:683–7.
- Toon PG, Arrand JR, Wilson LP, Sharp DS. Human papillomavirus infection of the uterine cervix of women without cytological signs of neoplasia. *Br Med J* 1986; **293**:1261–4.
- Veress G, Csiky-Meszaros T, Czegledy J, Gergely L. Oral contraceptive use and human papillomavirus infection in women without abnormal cytological results. *Med Microbiol Immunol* 1992; **181**:181–9.
- Rocha-Zavaleta L, Yescas G, Cruz RM, Cruz F. Human papillomavirus infection and cervical ectopy. *Int J Gynecol Obstet* 2004; **85**:259–66.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 1989; **7**:209–14.
- Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Amplification and typing of multiple cervical cancer-associated human papillomavirus DNAs using a single pair of primers. *Int J Cancer* 1990; **45**:990–2.
- Saiki RA, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA DQ alpha DNA with allele specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; **324**:163–6.
- Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1996; **34**:2095–100.
- Sotlar K, Diemer D, Dethlefs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:3176–84.
- Speich N, Schmitt C, Bollmann R, Bollmann M. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the west German area. *J Med Microbiol* 2004; **53**:125–8.
- Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. *Infect Agent Cancer* 2007; **2**:11.
- Husnjak K, Grce M, Magdic L, Pavelic K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* 2000; **88**:125–34.
- Castle PE, Jeronimo J, Schiffman M, Herrero R, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Res* 2006; **66**:1218–24.
- Bratti MC, Rodriguez AC, Schiffman M, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, et al. Description of a seven-year prospective study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia among 10,000 women in Guanacaste, Costa Rica. *Rev Panam Salud Publ* 2004; **15**:75–89.
- Kudelova M, Krivos V, Raslova H, Valovicova M, Belvonicikova P, Matis J. Occurrence of human papillomavirus 16 and 18 in smears from the two cervix regions of onco-gynecological patients in Slovakia. *Acta Virol* 2008; **52**:17–22.
- Chen Z, Fu L, Herrero R, Schiffman M, Burk RD. Identification of a novel human papillomavirus (HPV97) related to HPV18 and HPV45. *Int J Cancer* 2007; **121**:193–8.
- Missaoui N, Hmissa S, Frappart L, Trabelsi A, Abdelkader AB, Traore C, et al. p16^{INK4A} overexpression and HPV infection in uterine cervix adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2006; **448**:597–603.
- Si-Mohamed A, Ndjoi-Mbiguino A, Cuschieri K, Onas IN, Colombet I, Ozouaki F, et al. High prevalence of high-risk oncogenic human papillomaviruses harbouring atypical distribution in women of childbearing age living in Libreville, Gabon. *J Med Virol* 2005; **77**:430–8.
- Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH, Liaw K-L, Barr E. Incidence and duration of cervical human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 infections in young women: an evaluation from multiple analytic perspectives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16**:709–15.
- Zhao C, Austin RM. Human papillomavirus DNA detection in Thinprep Pap test vials is independent of cytologic sampling of the transforming zone. *Gynecol Oncol* 2007; **107**:231–5.
- Sjvarger CC, Gonzalez JV, Prieto A, Messmer AG, Mallimaci MC, Alonio VL, et al. Cervical infection epidemiology of human papillomavirus in Ushuaia, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2006; **38**:19–24.
- Depuydt CE, Benoy IH, Bailleul EJ, Vandepitte J, Vereecken AJ, Bogers JJ. Improved endocervical sampling and HPV viral load detection by cervix-brush[®] combi. *Cytopathology* 2006; **17**:374–81.
- Brink AATP, Meijer CJLM, Wiegierinck MAHM, Nieboer TE, Kruitwagen RFFPM, van Kemenade F, et al. High concordance of results of testing for human papillomavirus in cervicovaginal samples collected by two methods, with comparison of a novel self-sampling device to a conventional endocervical brush. *J Clin Microbiol* 2006; **44**:2518–23.
- Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJF, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005; **366**:991–8.
- Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001; **91**:412–20.
- Lizano M, De la Cruz-Hernandez E, Carrillo-García A, García-Carranca A, Ponce de Leon-Rosales S, Dueñas-Gonzalez A, et al. Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecol Oncol* 2006; **102**:230–5.
- Critchlow CW, Wolner-Hanssen P, Eschenbach DA, Kiviat NB, Koutsky LA, Stevens CE, et al. Determinants of cervical ectopia and of cervicitis: age, oral contraception, specific cervical infection, smoking, and douching. *Am J Obstet Gynecol* 1995; **173**:534–43.
- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Franceschi S, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 2007; **370**:1609–21.
- Green J, Berrington de Gonzalez A, Smith JS, Franceschi S, Appleby P, Plummer M, et al. Human papillomavirus infection and use of oral contraceptives. *Br J Cancer* 2003; **88**:1713–20.
- Sasagawa T, Rose RC, Azar KK, Sakai A, Inoue M. Mucosal immunoglobulin-A and -G response to oncogenic human papillomavirus capsids. *Int J Cancer* 2003; **104**:328–35.
- Passmore J-AS, Marais DJ, Sampson C, Allan B, Parker N, Milner M, et al. Cervico-vaginal, oral, and serum IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol* 2007; **79**:1375–80.
- Mbulawa ZZA, Williamson A-L, Stewart D, Passmore J-AS, Denny L, Allan B, et al. Association of serum and mucosal neutralizing antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) with HPV-16 infection and cervical disease. *J Gen Virol* 2008; **89**:910–4.
- White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA. In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralizing of authentic human papillomavirus type 16. *J Virol* 1998; **72**:959–64.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet* 2006; **367**:1247–55.
- Schwarz TF. AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 vaccination: recent advances in cervical cancer prevention. *Expert Rev Vaccines* 2008; **7**:1465–73.