



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“Presencia de VPH de alto riesgo en muestras
cervicovaginales y su relación con expresión de HOXC11
y EZH2”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

PRESENTA
Irving Iván Hernández Islas

ASESORA
Dra. Patricia Piña Sánchez
COASESORA
M en C Ana Laura Vázquez Martínez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



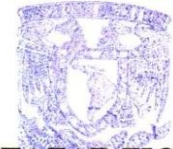
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Presencia de VPH de alto riesgo en muestras cervicovaginales y su relación con expresión de HOXC11 y EZH2.

Que presenta el pasante: **Irving Iván Hernández Islas**
Con número de cuenta: **312264105** para obtener el título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Marzo de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	_____
2do. SUPLENTE	LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.D. A. 34.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Presencia de VPH de alto riesgo en muestras cervicovaginales y su relación con expresión de HOXC11 y EZH2.

Que presenta el pasante: Irving Iván Hernández Islas
Con número de cuenta: 312264105 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Marzo de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Presencia de VPH de alto riesgo en muestras cervicovaginales y su relación con expresión de HOXC11 y EZH2.

Que presenta el pasante: Irving Iván Hernández Islas

Con número de cuenta: 312264105 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Marzo de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C Ana Laura Vázquez Martínez	_____
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	_____
2do. SUPLENTE	LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Presencia de VPH de alto riesgo en muestras cervicovaginales y su relación con expresión de HOXC11 y EZH2.

Que presenta el pasante: Irving Iván Hernández Islas

Con número de cuenta: 312264105 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Marzo de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>M. en C Ana Laura Vázquez Martínez</u>	_____
VOCAL	<u>M. en C. María Guadalupe Avilés Robles</u>	_____
SECRETARIO	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Paola Edith Briseño Lugo</u>	<u></u>
2do. SUPLENTE	<u>LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.E.D. A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SECRETARÍA GENERAL
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Presencia de VPH de alto riesgo en muestras cervicovaginales y su relación con expresión de HOXC11 y EZH2.

Que presenta el pasante: **Irving Iván Hernández Islas**
Con número de cuenta: **312264105** para obtener el título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Marzo de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C Ana Laura Vázquez Martínez	_____
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	_____
2do. SUPLENTE	LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera	<u>RMAC</u>

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Este trabajo forma parte del proyecto:

Validación de biomarcadores asociados al desarrollo y pronóstico de neoplasias atribuidas a la infección del virus del papiloma humano con número de registro R-2017-3602-31 ante el Comité Local de Investigación Científica del IMSS y con apoyo financiero de Fondos Sectoriales CONACyT 2017 con número de registro 290427.

Agradecimientos

A mis padres que les debo todo lo que soy hasta ahora, nunca terminare de agradecerles todo su amor, apoyo, dedicación, y paciencia. Son mi guía y lo más importante en mi vida.

A la Dra. Patricia Piña Sánchez por confiar en mí, abrirme las puertas de su laboratorio para realizar este proyecto, y ser una gran inspiración para incursionarme en ámbito de la investigación.

A mis amigas que admiro, quiero, las considero parte de mi familia y son elementales en mi vida BD Ana Itzel Cruz Barajas, BD Nancy Flores Hernández, BD Brenda Retana Ramírez, BD Itzel Baltazar Pérez, Internacionalista Azucena Guzmán Roblero, y QFB Sarahi Ovando Sánchez.

A mi mejor amiga BD Jazmín Ruíz Sánchez por ser esencial en mi vida, y apoyarme en todo momento.

Al equipo del laboratorio de oncología molecular conformado por c.Dr.C Galo Méndez Matías, Biol. Rosa Sánchez Sandoval, pQFB Abigail Barco Bazán, pMedicina Alma Flor Corona Garatachea, M.C Erick López, H.T Miguel Sandoval Hernández e H.T Daniel Enríquez Ramírez, con los cuales viví esta extraordinaria experiencia, y fueron indispensables para el desarrollo de este proyecto.

A mis maravillosos profesores que fueron fundamentales en mi desarrollo profesional, en especial M en C Maritere Domínguez Rojas, M en C Paola Briseño Lugo, B.D María de los Ángeles López Cabrera, M en C Guadalupe Avilés Robles, Dra Dolores Molina Jasso y sobre todo a la M en C Ana Laura Vázquez Martínez por ser una excelente docente, y guiarme durante todo este proceso.

Índice

1. Índice de figuras	1
2. Índice de tablas.....	2
3. Abreviaturas.....	3
4. Resumen	4
5. Introducción	5
5.1 Cáncer.....	5
5.2 Cáncer cervicouterino	5
5.3 Anatomía e histología del cuello uterino.....	7
5.4 Virus del papiloma Humano (VPH).....	9
5.4.1 Historia.....	9
5.4.2 Características.....	9
5.4.3 Clasificación.....	10
5.4.4 Proteínas del VPH	11
5.4.5 Mecanismo de infección	12
5.5 Historia natural de la enfermedad.	13
5.6 Coinfecciones.....	15
5.7 Prevalencia de VPH-AR en México.....	16
5.8 Cofactores de riesgo	19
5.9 Prevención primaria.	20
5.10 Prevención secundaria.....	20
5.10.1 Papanicolaou (PAP) e Inspección visual de ácido acético (IVA)	21
5.10.2 Detección molecular de VPH	21
5.10.2.1 COBAS 4800 ®.....	21
5.10.3 TRIAGE	23
5.11 Genes HOX.....	26
5.11.1 HOXC 11	28
5.12 Gen EZH2.....	30
6. Justificación	34
7. Hipótesis	35
8. Objetivos.....	35
8.1 General	35

8.2 Particulares	35
9. Materiales y métodos.....	35
9.1 Población de estudio.....	35
9.2 Criterios de selección.....	36
9.2.1 Criterios de Inclusión	36
9.2.2 Criterios de exclusión.....	36
9.2.3 Criterios de eliminación.....	36
9.3 Proceso de trabajo	36
9.4 Análisis de datos	38
9.5 Diagrama de flujo	39
10. Resultados.....	40
10.1 Características clínicas y frecuencia de VPH-AR en muestras de tamizaje y displasia	40
10.2 Diferencias en la prevalencia de VPH y factores de riesgo en pacientes del programa de tamizaje las poblaciones estudiadas.....	47
10.3 Diferencias en la prevalencia de VPH y factores de riesgo en pacientes procedentes de clínica de displasias en las poblaciones estudiadas.....	54
10.4 Cambios de expresión HOXC11 y EZH2 en muestras cervicovaginales. 60	
10.4.1 Expresión a nivel de proteína	60
11. Discusión	64
12. Conclusiones	71
13. Bibliografía.....	72
14. Anexos	80

1. Índice de figuras

Figura 1. Características biológicas del cáncer.	5
Figura 2. Tasa de incidencia y mortalidad de CaCu en México.....	6
Figura 3 Estadios del cáncer cervicouterino.....	7
Figura 4 Anatomía macroscópica del cuello uterino.....	7
Figura 5 Histología del cérvix.	8
Figura 6 Diagrama de cómo sigue madurando la metaplasia escamosa incipiente.	8
Figura 7 Virus del papiloma humano.....	9
Figura 8. Árbol filogenético de los Alphapapillomavirus	10
Figura 9 Principales vías de señalización de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.....	12
Figura 10. Historia natural del CaCu.	14
Figura 11 Comparación de los VPH-AR presentes en muestras cervicovaginales de mujeres mexicanas con y sin lesiones cervicales	16
Figura 12 Algoritmo de tamizaje y diagnóstico de CaCu.....	23
Figura 13 Tinción dual p16 y Ki67 en células de cérvix.....	24
Figura 14 Organización genómica y patrones de expresión colineal de genes Drosophila HOM y genes Hox de mamíferos	26
Figura 15 Estructura de una proteína HOX	27
Figura 16 Mecanismos de acción de EZH2.....	30
Figura 17 Modificaciones epigenéticas por la oncoproteína E7 del VPH-AR ...	33
Figura 18 Sistema de flujo de trabajo del equipo COBAS 4800®	37
Figura 19 Prevalencia de casos positivos a VPH-AR por grupo de edad.....	42
Figura 20 Prevalencia de casos positivos a VPH-AR por número de parejas	43
Figura 21 Prevalencia de casos positivos a VPH-AR por IVS.....	44
Figura 22. Prevalencia de casos positivos a VPH-AR por número de embarazos.....	45
Figura 23 Prevalencia de casos positivos a VPH-AR por consumo de tabaco	45
Figura 24 Prevalencia de casos positivos a VPH-AR por método anticonceptivo	46
Figura 25. Prevalencia de los tipos virales VPH-AR.....	47
Figura 26 Prevalencia de VPH-AR positivo en el programa de tamizaje por sede	48

Figura 27. Distribución de tipos virales de VPH-AR en el programa de tamizaje.....	49
Figura 28. Comparativo de la prevalencia de casos positivos de VPH-AR por sede dependiendo de las características clínicas.	53
Figura 29 Prevalencia de VPH-AR positivo en clínica de displasias por sede.	54
Figura 30 Distribución de los tipos virales de VPH-AR en clínica de displasias por sede.	56
Figura 31 Comparativo de la prevalencia de casos positivos de VPH-AR por sede dependiendo de las características clínicas	59
Figura 32 Inmunocitoquímica de SiHa y Caski.....	60
Figura 33 Expresión proteica de HOXC11 y EZH2pS21 en muestras cervicovaginales.....	61
Figura 34 Análisis de expresión proteica en muestras cervicovaginales.....	62
Figura 35 Expresión cuantitativa de la expresión proteína nuclear de HOXC11.....	62
Figura 36 Expresión cuantitativa de la expresión proteína nuclear de EZH2Ps21.....	63

2. Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de VPH por la IARC.....	10
Tabla 2. Proteínas estructurales y funcionales de VPH	11
Tabla 3. Equivalencia entre la terminología NIC, Bethesta y LAST	13
Tabla 4. Prevalencia de VPH AR en displasias.....	17
Tabla 5. Prevalencia de VPH-AR en citologías normales	18
Tabla 6. Vacunas preventivas contra VPH.....	20
Tabla 7. Características clínicas y presencia de VPH en la población analizada.....	41
Tabla 8 Prevalencia de VPH-AR en programa de tamizaje por sede.....	47
Tabla 9 Distribución de genotipos de VPH-AR en muestras positivas	48
Tabla 10 Distribución de mono y coinfecciones por sede de pacientes que acuden al programa de tamizaje	49
Tabla 11 Prevalencia de VPH-AR en clínica de displasias por sede.....	54
Tabla 12. Distribución de genotipos de VPH-AR en muestras positivas	55
Tabla 13. Distribución de infecciones únicas y múltiples por sede en clínicas de displasias.....	55

3. Abreviaturas

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ASCUS: Células escamosas atípicas de significado incierto

CaCu: Cáncer Cervicouterino

CNEGSR: Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva

CDKN2A: Supresor inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A

EZH2: Enhancer of Zeste Homologue 2

EZH2p S21: EZH2 fosforilado en la Serina 21.

GDPH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

H3K27me3: Histona 3 trimetilada en la Lisina 27

H3K4me3: Histona 3 trimetilada en la lisina 4

HPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa

HSPG: Proteoglicanos de heparán sulfato

IARC: International Agency for Research on Cancer

ICO: Instituto Catalán de Oncología

INCan: Instituto Nacional de Cancerología

IVA: Inspección visual con ácido acético al 3-5%

KDM6A/B: lisina desmetilasa 6A B

LIE: Lesión Intraepitelial Escamosa

LIEAG: Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto Grado

LIEBG: Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical

NOM: Norma Oficial Mexicana

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTB: Oclusión Tubaria Bilateral o Salpingoclasia

PAP: Papanicolaou

PBX1: Pre-B-cell leukemia transcription factor 1

PRb: Proteína del retinoblastoma

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PRC 2: Complejo represivo Polycom 2

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

UEC: Unión escamoso-cilíndrica

VPH: Virus del Papiloma Humano

VPH-AR: Virus del Papiloma Humano de alto riesgo

4. Resumen

Antecedentes. El Cáncer Cervicouterino (CaCu) sigue representando un problema de salud pública en México, por ser la tercera neoplasia más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. El principal agente causal de esta neoplasia es la infección persistente del Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-AR). Por ello la detección de VPH-AR es una de las principales estrategias de tamizaje para el control del CaCu. Sin embargo, debido a que aproximadamente 80% de las infecciones por VPH-AR puede resolverse de manera natural en un lapso de 12 meses, se han desarrollado estrategias de triage a través de la identificación de marcadores moleculares, para identificar a las mujeres positivas a VPH-AR con mayor probabilidad de progresar o presentar una lesión precursora del CaCu. Adicionalmente, otros factores pueden contribuir a la persistencia de la infección viral y al desarrollo de lesiones precursoras, las cuáles presentan diversos cambios celulares y moleculares a causa del VPH; entre los cuáles se encuentra alteraciones en la expresión de los genes HOX. Los genes HOX son factores de transcripción indispensables para la diferenciación y proliferación celular y participan en el proceso carcinogénico. Uno de los mecanismos epigenéticos de su regulación transcripcional es por la metilación de histonas en su región promotora, mediada por EZH2. La expresión y función de EZH2 es modificada por la oncoproteína E7 del VPH-AR, al fosforilarlo en la Serina 21 a través de la vía PI3/Akt. Por lo tanto, alteraciones en la regulación de HOX y EZH2 podrían ser indicadores de transformación oncogénica temprana inducida por VPH-AR.

Objetivo. Identificar en muestras cervicovaginales provenientes del programa de tamizaje y de clínicas de displasias, la prevalencia de VPH-AR y los cambios en la expresión de HOXC11 y EZH2.

Material y métodos. En este trabajo se determinó la prevalencia de VPH-AR en muestras cervicovaginales de mujeres que acuden al programa de tamizaje de CaCu del IMSS y de pacientes referidas a clínicas de displasias de la CDMX, Puebla, Península de Yucatán y Guerrero, así como sus factores de riesgo. Se identificó la expresión de HOXC11 y EZH2pS21 mediante inmunohistoquímica en muestras VPH-AR positivas seleccionadas. **Resultados.** Se identificó 22% de las muestras de tamizaje positivas a VPH-AR, y 44% de clínica de displasias. 70% de las muestras positivas poseen un genotipo diferente a 16 y 18 que puede ser 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Se identificó mayor prevalencia de coinfecciones en pacientes referidas a la clínica de displasias (14.5%) que en las de tamizaje (9.8%). Respecto a los cofactores de riesgo, el inicio de vida sexual antes de los 18 años y más de 4 parejas sexuales se asocian significativamente a la presencia del VPH-AR. Respecto a la expresión de EZH2p21 y HOXC11 se identificaron sobre expresados a nivel de proteína en muestras positivas a VPH-AR, respecto a las negativas. Sin embargo, solo en el caso de HOXC11 hay una correlación directa entre los niveles de la proteína y con la presencia de VPH-AR o de transformación temprana

Palabras clave: VPH-AR, HOXC11, EZH2, displasia, tamizaje

5. Introducción

5.1 Cáncer

Se entiende como el conjunto de enfermedades, que se caracteriza por el crecimiento autónomo y descontrolado de células y tejidos, generando la pérdida de la homeóstasis del organismo (Figura 1). Ese crecimiento da lugar a tumores, que pueden invadir tejidos circundantes y provocar nuevos tumores similares al cáncer original, en partes distantes del cuerpo, proceso llamado metástasis. A medida que crece, el cáncer destruye los tejidos normales y compite por los nutrientes y el oxígeno (OMS, 2016).

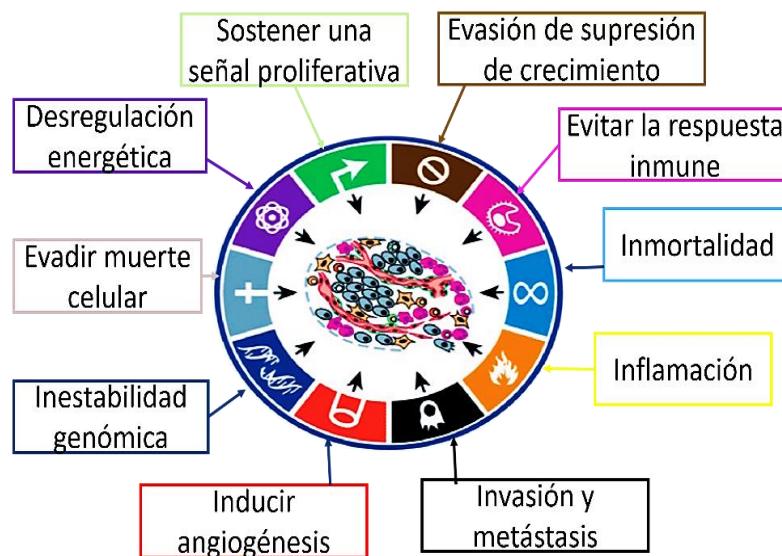


Figura 1. Características biológicas del cáncer. Las 8 capacidades posiblemente funcionales, distintas, y complementarias, así con 2 facilitadoras (Inestabilidad genómica e inflamación) necesarias para el desarrollo de cáncer. Modificado de Hannahan y Weinberg 2011

5.2 Cáncer cervicouterino

A nivel mundial en 2018 el cáncer cervicouterino (CaCu) fue el 3er cáncer más frecuente en mujeres con una estimación de 569,847 casos nuevos y 311,365 muertes a causa de esta enfermedad. En México de igual manera es la 3er neoplasia más frecuente en mujeres, se estima que en 2018 se diagnosticaron alrededor de 7,869 casos nuevos y más de 4,000 decesos, convirtiendo a esta patología en la segunda causa de muerte por cáncer (GLOBOCAN, 2018). La infección persistente por los tipos de VPH de alto riesgo (VPH-AR) es la causa del 99% de los casos de CaCu, además de la infección del agente etiológico existen cofactores de riesgo que aumentan la probabilidad de la persistencia de la infección y desarrollo de lesiones precursoras del CaCu y del mismos CaCu; como la edad, número de parejas sexuales, edad de inicio de vida sexual, número de embarazos, tabaquismo, alcoholismo y uso prolongado de anticonceptivos hormonales (Burk, *et al.* 1996 Adam *et al* 2000). Este virus se transmite por contacto sexual y afecta a 8 de cada 10 personas en algún momento de su vida, pero la mayoría de dichas infecciones son transitorias y resueltas de manera natural por el sistema inmune, en donde solo 1 de cada

1000 mujeres desarrolla este tipo de cáncer. El 80% de CaCu es de células escamosas, e inician en la zona de transformación del exocérvix; el 15% son adenocarcinomas que surgen en la capa cilíndrica glandular del endocérvix, y el 5% restante son tumores neuroendocrinos del cérvix (OMS, 2016).

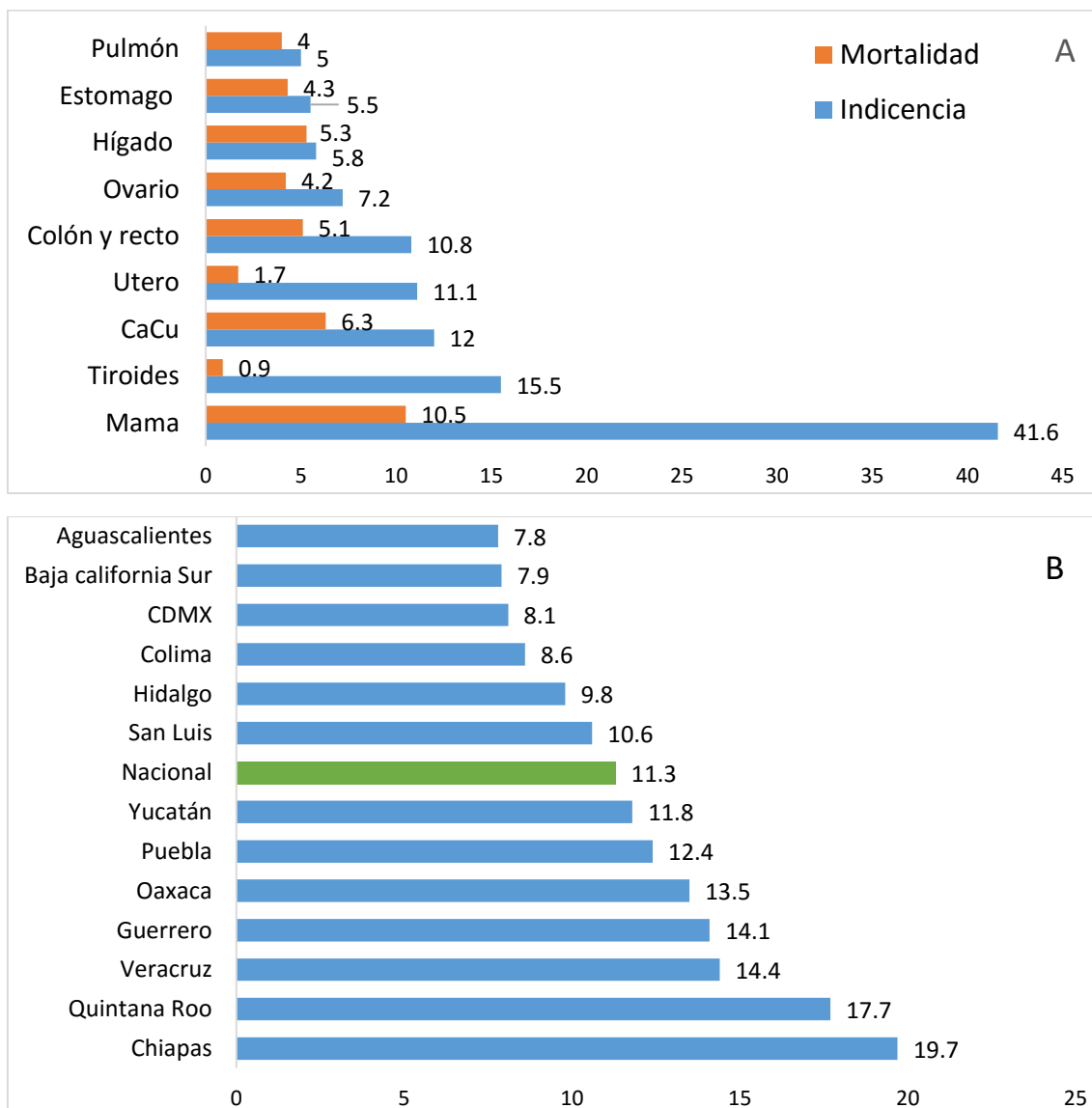


Figura 2. A) Tasa de mortalidad e incidencia de cáncer en mujeres mexicanas. Estimación de la tasa por cada 100,000 mujeres mayores de edad, dependiendo del sitio anatómico donde se presente el cáncer. Siendo el CaCu 3ro en incidencia y el 2do en mortalidad. GLOBOCAN 2018. **B) Tasa de mortalidad de CaCu en México.** Tasa por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años, en los diferentes estados de la república mexicana. Recuperado del CNEGSR 2017.

Tanto a nivel mundial como en México, existen variaciones en la incidencia de la mortalidad de CaCu (Figura 2B), lo cual, se relaciona con la situación económica (niveles de pobreza), acceso limitado a los servicios de salud, y calidad de los mismos. Otros factores que influyen son la ubicación geográfica (en especial las zonas rurales), bajos niveles de educación, aspectos culturales y psicosociales, la cobertura de los programas de tamizaje del CaCu, una atención paliativa inadecuada y un tratamiento incompleto (Lewis *et al*, 2004).

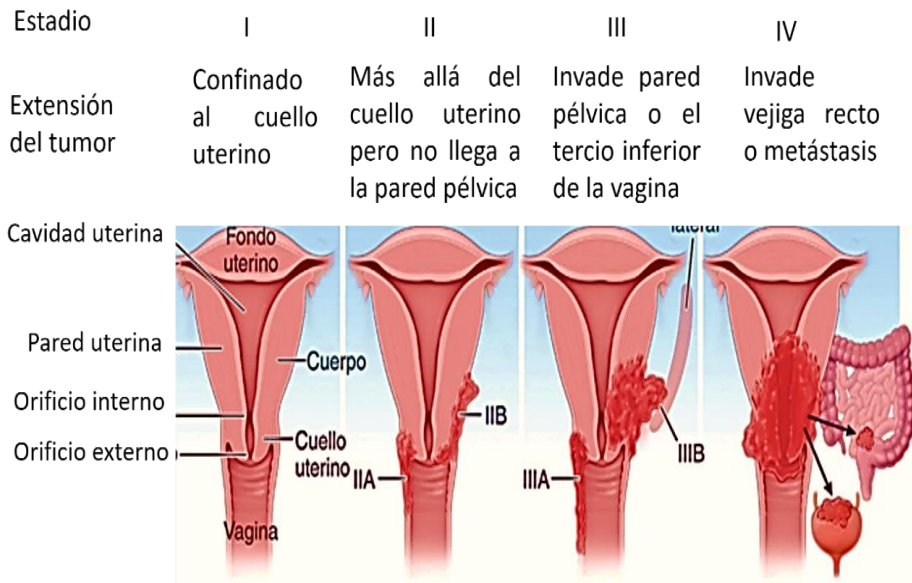


Figura 3. Estadios del CaCu. La guía realizada por la Federación Internacional Gineco-Obstetricia, indica que la clasificación de los tumores de cérvix es en 4 etapas, dependiendo básicamente por la extensión anatómica del tumor. Modificado de Kasper 2016

5.3 Anatomía e histología del cuello uterino

El cuello uterino es la parte fibromuscular inferior del útero su forma es cilíndrica o cónica, mide de 3 a 4 cm de largo y 2,5 cm de diámetro, aunque su tamaño varía según la edad, el número de partos y el momento del ciclo hormonal de la mujer. Se divide principalmente en 2 porciones, la parte inferior del cuello uterino (exocérnix) queda expuesta a la vagina, y es observable con un espéculo; los dos tercios superiores del cuello uterino (endocérnix), residen por encima de la vagina y no son observables (Figura 4) (Martin *et al.* 2017).

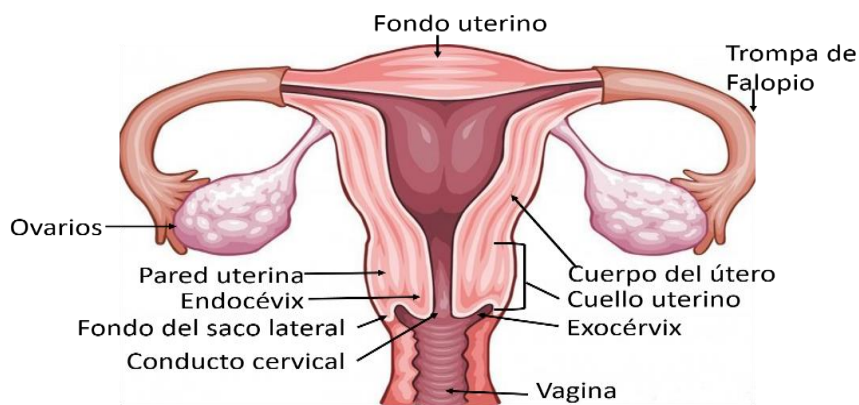


Figura 4. Anatomía macroscópica del cuello uterino. Modificado de Kasper 2016

El cuello uterino está recubierto por 2 tipos de epitelio (figura 5):

- Epitelio escamoso estratificado no queratinizante: Contiene glucógeno, recubre gran parte del exocérnix, es opaco, de color rosa pálido, forma de 15 a 20 capas celulares. Su maduración depende del estrógeno, ya que en ausencia de esta hormona no prolifera, ni produce glucogénesis, en mujeres menopáusicas las células no se acumulan y no llegan más allá del estrato parabasal (Martin *et al.* 2017).

- Epitelio cilíndrico. Está compuesto de una única capa de células altas, con núcleos oscuros, cerca de la membrana basal, recubren el conducto cervical, no produce glucogénesis, ni mitosis, al ser una capa única su altura es mucho menor a la del epitelio escamoso, debido a la falta de glucógeno no cambia de color tras aplicación de Lugol (Martin, *et al* 2017).
- Estos dos tipos de epitelio confluyen en la unión escamoso-cilíndrica (UEC) o zona de transformación (Martin, *et al* 2017).

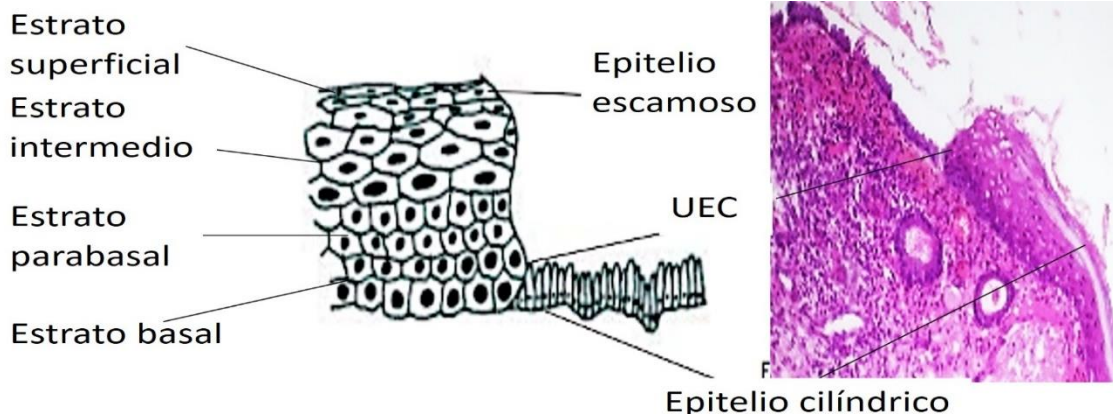


Figura 5. Histología del cérvix. Representación esquemática y corte histológico del cérvix teñido con hematoxilina y eosina a 20 x, del epitelio escamoso, epitelio cilíndrico y la zona donde confluyen estos dos tipos de epitelios denominado UEC. Modificado de Sellors 2013.

El reemplazo fisiológico del epitelio cilíndrico evertido por un epitelio escamoso neoforado en el cuello uterino se denomina metaplasia escamosa, esto ocurre de manera natural en todas las mujeres. El VPH-AR pueden infectar persistentemente las células metaplásicas escamosas basales inmaduras, y transformarlas en células atípicas con anomalías nucleares y citoplasmáticas. La proliferación no controlada de estas células atípicas, pueden conducir a la formación de un epitelio displásico anormal, que puede volver a su estado normal, persistir o evolucionar a cáncer al cabo de varios años (Sellors, 2003)

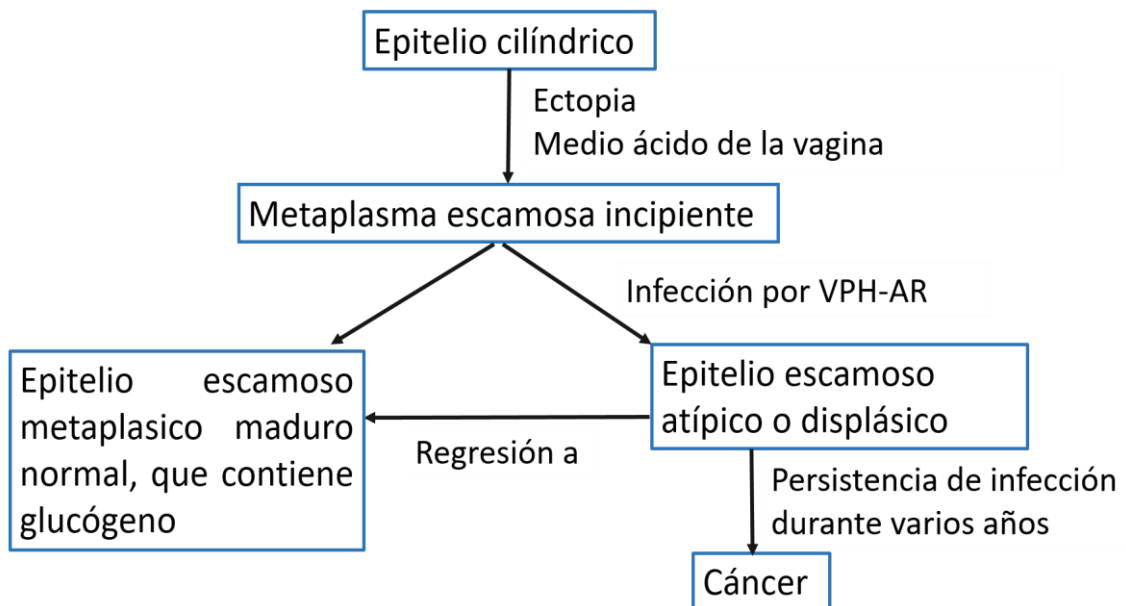


Figura 6. Diagrama esquemático de cómo sigue madurando la metaplasia escamosa incipiente. Modificado de Sellors 2003.

5.4 Virus del papiloma Humano (VPH)

5.4.1 Historia

La transmisión sexual, como un factor de riesgo para el desarrollo de CaCu, fue descrita desde 1842 por Domenico Rigoni-Stern, mientras que el origen infeccioso de las verrugas fue establecido en 1907 por Giuseppe Ciuffo. En 1956 Koss y Durfe acuñaron el término atipia coliocítica, a cambios en células cervicales caracterizados por vacuolas perinucleares, de pacientes con displasia y CaCu. En 2002 los virus de la familia *Papillomaviridae* fueron clasificados como una familia independiente (de Villiers, et al 2004)

En 1977, con el ADN del VPH 1 como sonda, Lutz Gissman identificó y aisló el genoma del VPH 6 de un condiloma acuminado, y descubrió el VPH 11 en un papiloma laríngeo (Gissman *et al.*1977). En 1983 el Dr. Harald Zur Hausen demostró que las verrugas genitales y los tejidos de CaCu, contienen genomas del VPH, de los tejidos analizados cerca del 60% poseía VPH 16 (Zur Hausen *et al* 1983), se hizo acreedor del premio Nobel de medicina en 2008 (Ochoa 2014).

5.4.2 Características

Es un virus que pertenece a la familia *Papillomaviridae*, esta familia posee 16 géneros. El género *Alphapapillomavirus* infecta a mucosas y epitelios humanos, está conformado 15 por especies que se dividen en tipos y subtipos dependiendo de la secuencia de L1. El VPH es pequeño, desnudo, icosaedro, mide entre 52 y 55 nm de diámetro, su cápside está compuesta de 72 capsómeros. El genoma viral es ADN de doble cadena. La región larga codificante (LCR) contiene al origen de replicación, y al promotor, al cual se unen factores de transcripción celulares y virales tempranos, que permiten la replicación y regulación génica. La región de proteínas tempranas (E) codifica para *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, y *E7*, necesarias para la replicación, expresión, inmortalización y transformación celular. La región de proteínas tardías (L) codifica para proteínas estructurales *L1* y *L2* que constituyen a la cápside (Doorbar, *et al.* 2012).

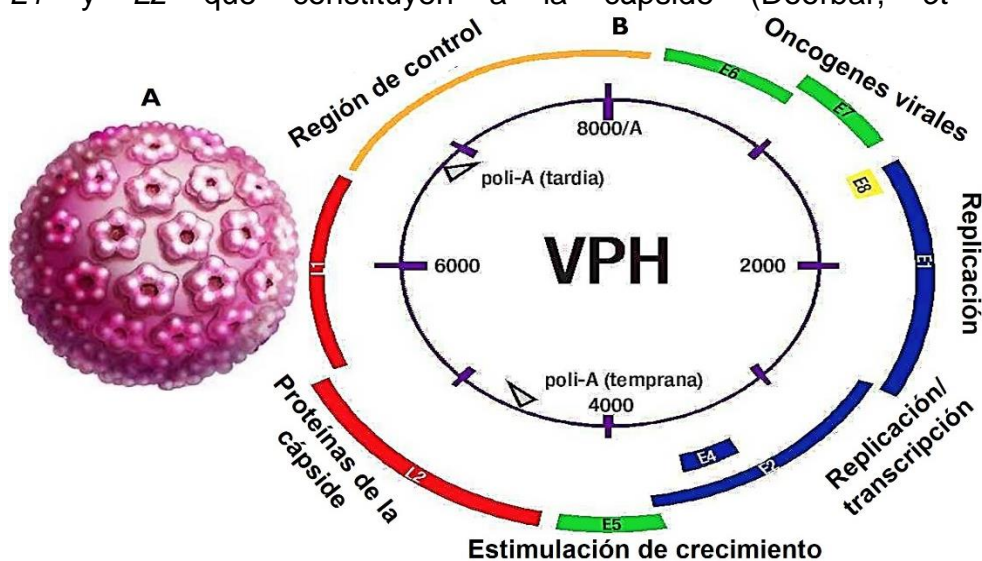


Figura 7. Virus del papiloma humano A) Modelo tridimensional del VPH. B) Genoma viral del VPH, LCR (amarillo), proteínas reguladoras E1, E2, y E4 (azul) oncogenes E5, E6 y E7 (verde) región de proteínas tardías L1 y L2 (rojo). Modificado de Zaldívar 2011.

5.4.3 Clasificación

El VPH capaz de infectar las mucosas se dividen en genotipos de alto y bajo riesgo, dependiendo si la infección que producen puede desarrollar cáncer.

Tabla 1. Clasificación de VPH por la IARC

Grupo	Características	Riesgo	Genotipos
1	Carcinogénico, existe evidencia de que producen cáncer en humanos.	Alto	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59
2 ^a	Probablemente carcinogénico	Alto	68
2B	Posiblemente carcinogénico, evidencia limitada en humanos	Intermedio	26,53,66,67,70,73 y 82
2B	Clasificados filogenéticamente con limitada evidencia de carcinogenicidad	Desconocido	30,34,68,86
3	Producen verrugas o condilomas benignos, además lo genotipos 6 y 11 papilomatosis laríngea	Bajo	6,11,40,42,44,54,61,71,72, 81, 89 y 90
Sin grupo	No incluidos en la clasificación del 2012 de la IARC	Desconocido/ Bajo	74,83,87, y 91

Modificado de IARC, 2012

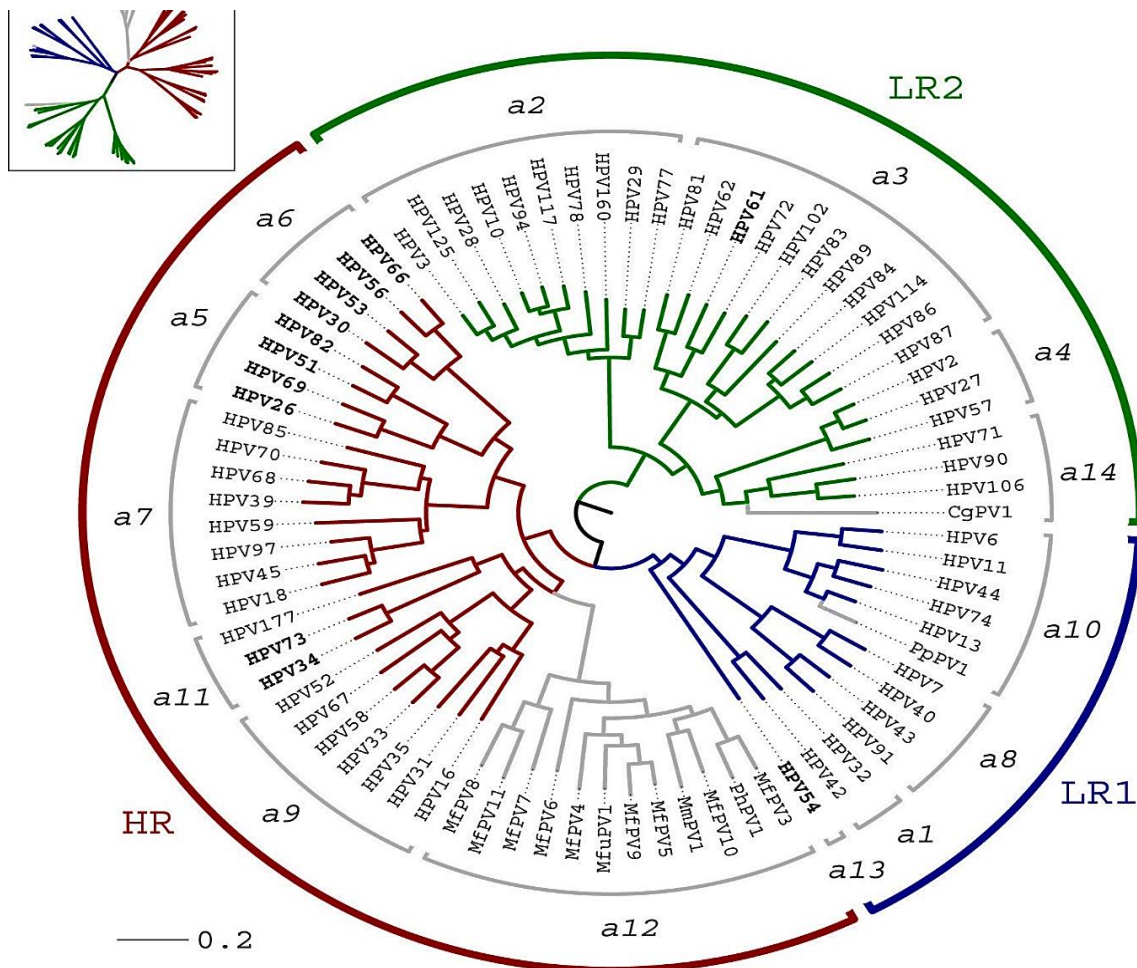


Figura 8. Árbol filogenético de los Alphasapillomavirus. Empleando un ancestro común *Samiri sciureus* del cual derivan 3 *papillomavirus* ancestrales que son responsables de los grupos heterogéneos: LR1 (α1, 8, 10 y 13), LR2 (α2, 3, 4 y 14) y HR (α5, 6, 7, 9 y 11). Los números entre corchetes indican la especie. Las ramas en gris representan aquellos que infectan a primates no humanos. HR: alto riesgo; LR: Bajo riesgo. Recuperado de Chen *et al* 2018.

5.4.4 Proteínas del VPH

Tabla 2. Proteínas estructurales y funcionales de VPH

	aa	Regiones y funciones
E1	681	<ul style="list-style-type: none"> -Carboxilo terminal: Actúa como helicasa generando la replicación y transcripción de genoma. -Dominio de unión al ADN. -Amino terminal: Es blanco de fosforilaciones o acetilaciones que influyen en su actividad, además permite la entrada y salida del núcleo celular del ADN viral. -Interactúa directamente con la ADN polimerasa, la cual a su vez se asocia con el complejo de replicación A, y así para iniciar el proceso de replicación (Bergvall, <i>et al</i> 2013).
E2	300	<ul style="list-style-type: none"> -Dominio de transactivación TAD: Responsable de la regulación de la transcripción y replicación viral, interaccionando con proteínas celulares. -Dominio de unión al ADN: Reconoce secuencias específicas <i>ACCGN4CGGT</i> que están en la región larga de control del genoma viral. -Región bisagra: Le da estabilidad a E2, participa en la localización citoplasmático-núcleo, y funciona como espaciador entre ambos dominios. -Reprime al promotor P97 (VPH 16) o P105 (VPH 18), ubicado próximo a la región <i>TATA box</i>, encargado de la transcripción de las proteínas E6 y E7, reduciendo de esta manera la síntesis de estas oncoproteínas (McBride, <i>et al.</i> 2013).
E4	170	<ul style="list-style-type: none"> -Regula la expresión de genes tardíos. -Colapsa los filamentos de queratina localizados en el citoplasma para la liberación de los viriones. -Inhibe la actividad de la quinasa dependiente de ciclina 1 (<i>Cdk1</i>) induciendo arresto del ciclo celular en la fase G2 (Doobar <i>et al.</i> 2013).
E5	83	<ul style="list-style-type: none"> -Induce la proliferación celular asociada a la sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico (<i>EGFR</i>), promoviendo la progresión tumoral. -Disminuye la actividad, e inhibe la acidificación de los endosomas, al unirse a la subunidad 16k de la <i>ATPasa vacuolar</i>. -Genera la degradación del regulador de apoptosis <i>Bax</i>, mediada por el proteosoma, produciendo la inhibición de la apoptosis (Oh Jm, <i>et al.</i> 2010).
E6	150	<ul style="list-style-type: none"> -Se asocia con la proteína asociada a E6 (<i>E6AP</i>), que al ser una ubiquitina ligasa produce la asociación con p53, para su degradación vía proteosoma, esto trae como consecuencia la inhibición de la apoptosis y descontrol del ciclo del celular. - Al tener un dominio de unión a PDZ, puede interactuar con proteínas con dominio PDZ como la proteína multi-PDZ (<i>MUPP</i>), Scribble, proteína asociada a sinapsis (<i>hDLG</i>), para su degradación, generando inhibición de la apoptosis, y transformación celular al desregular las interacciones célula-célula y la polaridad celular. (Mantovi, <i>et al.</i> 2001).
E7	100	<ul style="list-style-type: none"> -Produce la degradación vía proteosoma de la proteína del retinoblastoma (<i>pRb</i>) induciendo la liberación de E2F, generando que la célula entre a la fase S del ciclo celular. Está implicada en procesos como transcripción génica, degradación proteica, reprogramación epigenética e integridad genómica (Munger, <i>et al.</i> 2001).
E8-E2-C	200	<ul style="list-style-type: none"> -Esta proteína de fusión es capaz de reprimir la replicación del ADN viral, así como su transcripción, juega el papel más importante en el mantenimiento de la latencia viral observada en las células basales del epitelio infectado.
L1	570	<ul style="list-style-type: none"> Compone el 80% de la cápside viral, se ancla a receptores de heparán sulfato de la célula para su reconocimiento e ingreso a la célula. Se sabe que 5 unidades de L1 se asocian entre si formando un pentámero de L1, en el hueco que forma el pentámero, se asocia una proteína L2, a este complejo se le llama capsómero, en total el VPH posee 72 capsómeros en una red icosaédrica. (Buck, <i>et al.</i> 2013)
L2	530	<ul style="list-style-type: none"> Constituye alrededor del 20% de la cápside viral, participa en la unión del virus a la célula (Wang, <i>et al.</i> 2013).

5.4.5 Mecanismo de infección

El VPH tiene tropismo por el queratinocito, infecta a las células epiteliales basales, ingresa al epitelio a través de micro lesiones, en particular en la zona de transformación, al entrar en contacto la proteína L1 con la célula, se une a los receptores proteoglicanos de heparán sulfato (Giroglou, *et al.* 2001). El extremo amino terminal de L2, es escindida por una furina una pro-proteína convertasa, provocando un cambio conformacional de la cápside viral, precedido de la liberación de los proteoglicanos, y asociación con un receptor putativo secundario (alfa/beta integrina), generando la entrada del virus a la célula por medio de endocitosis de manera lenta y asincrónicamente (Yoon, *et al.* 2001).

En el citoplasma celular ocurre la degradación de la cápside, a través de un proceso de reducción química que rompe los puentes disulfuro que estabilizan la cápside, originando capsómeros y monómeros, los cuales, son transportados al núcleo junto con el ADN viral. La infección de estas células por VPH provoca la producción de 20-100 copias extra cromosómicas de ADN viral (episomas) (Li, *et al.* 1998). Las células basales proliferantes migran a los estratos parabasal y espinoso, amplificándose la expresión de genes virales tempranos a través de la región no codificante, los cuales permiten producir ADN a cientos de copias por célula; esta etapa en el ciclo viral es conocida como la fase proliferante, posteriormente ocurre el ensamblaje de los viriones en el citoplasma para su posterior liberación mediante el rompimiento de los complejos de citoqueratina gracias a la participación de E4. El virus es capaz de infectar a nuevas células al ser estable extracelularmente y resistir a la desecación (Doorbar, *et al.* 1991).

En raras ocasiones ocurre la integración del genoma viral al genoma celular, interrumpiendo el ciclo proliferante, así evitando la formación de nuevos viriones. La integración viral produce el aumento de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 (figura 9), ya que hay un rompimiento del marco de lectura abierto de E2, como consecuencia puede haber una progresión a cáncer. (Banks, *et al.* 2012).

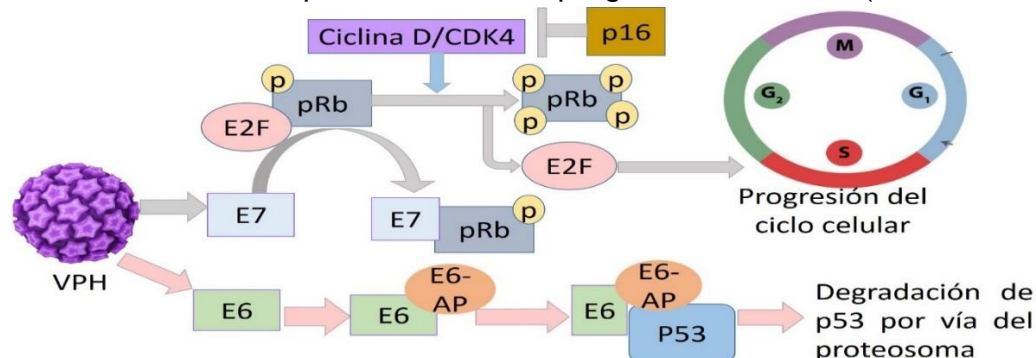


Figura 9. Principales vías de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-AR. pRb en forma hipofosforilada se asocia a E2F, produciendo el bloqueo del ciclo celular, al hiperfosforilarse por el complejo *Ciclina D-CDK4* se disocia de E2F. E2F favorece la transcripción principalmente de ciclina E y CDK2 necesarias para la transición de la fase G1 a S. E7 se asocia a pRb generando que E2F prosiga con su función transcripcional, produciendo progresión incontrolada del ciclo celular. E6 se asocia con E6AP, generando ubiquitinización de p53, y su degradación por la vía del proteosoma, disminuyendo los niveles de p53 y como consecuencia aumento en el daño al ADN, evasión de la apoptosis y progresión del ciclo celular. Modificado de Kobayashi 2018.

5.5 Historia natural de la enfermedad.

El VPH es altamente transmisible, la mayoría de los hombres y mujeres sexualmente activos adquiere la infección durante su vida. Las infecciones genitales por VPH son transmitidas principalmente por contacto sexual. El 80% de las infecciones son asintomáticas, auto limitadas, transitorias y benignas, por lo que son aclaradas sin recibir un tratamiento en un periodo de 6 a 18 meses por el sistema inmune, en el otro 20% las infecciones son persistentes y, puede conducir al desarrollo de lesiones precancerosas denominadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC) o lesiones escamosas intraepiteliales (LIE), estas últimas se dividen en bajo y alto grado dependiendo del riesgo que poseen para el desarrollo de CaCu. El intervalo medio para que los precursores progresen a cáncer invasor, va de 10 a 20 años. Alrededor del 60% de LIEBG regresará a la normalidad después de 1 año. Las mujeres con LIEAG tienen un alto riesgo de desarrollar CaCu, aunque el tiempo promedio para la progresión es de varios años y un pequeño porcentaje aún puede aclararse la infección y tener regresión (Figura 10) (Crosbie 2013; Mello, *et al* 2019).

Tabla 3. Equivalencia entre la terminología NIC, Bethesda y LAST

OMS (1968)	NIC (1973)	Bethesda (2001)	Terminología LAST (2012)	Características
Negativo a células malignas	Negativo	Negativo a LIE	Negativo	No hay cambios morfológicos, o células anormales, pero no es posible saber si es inflamación, infección, o irritación
Atipia coilocítica	Atipia coilocítica	Cambios benignos: ASCUS/AGUS	-LIEBG -Epitelio glandular anómalo	Visualización de cambios citopáticos: células atípicas con una cavitación o halo peri nuclear en el citoplasma (coilocito), Mínimas anomalías nucleares en células superficiales o intermedias, pocas figuras mitóticas, membrana nuclear irregular.
Displasia leve	NIC 1	LIEBG		
Displasia moderada	NIC 2	LIEAG	-LIEAG	Anomalía en núcleos de células basales y parabasales, anisocariosis con relación núcleo-citoplasma 3:1, hiper cromasia, hiperplasia del estrato basal, pérdida de la polaridad celular, atipia citológica y figuras de mitosis atípicas, marcador p16 positivo.
Displasia grave/ Cáncer <i>in situ</i>	NIC 3		-Lesión intraepitelial glandular	
Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor		Pérdida total de la morfología normal, anisocariosis marcada e hiper cromasia. Carcinomas escamocelulares aparecen como redes infiltrantes de bandas de células neoplásicas separadas por estroma, con gran variación en los patrones de crecimiento, tipos de células y grado de diferenciación.

Recuperado y modificado de Richart 1973; Solomon 2001; Darragh 2012.

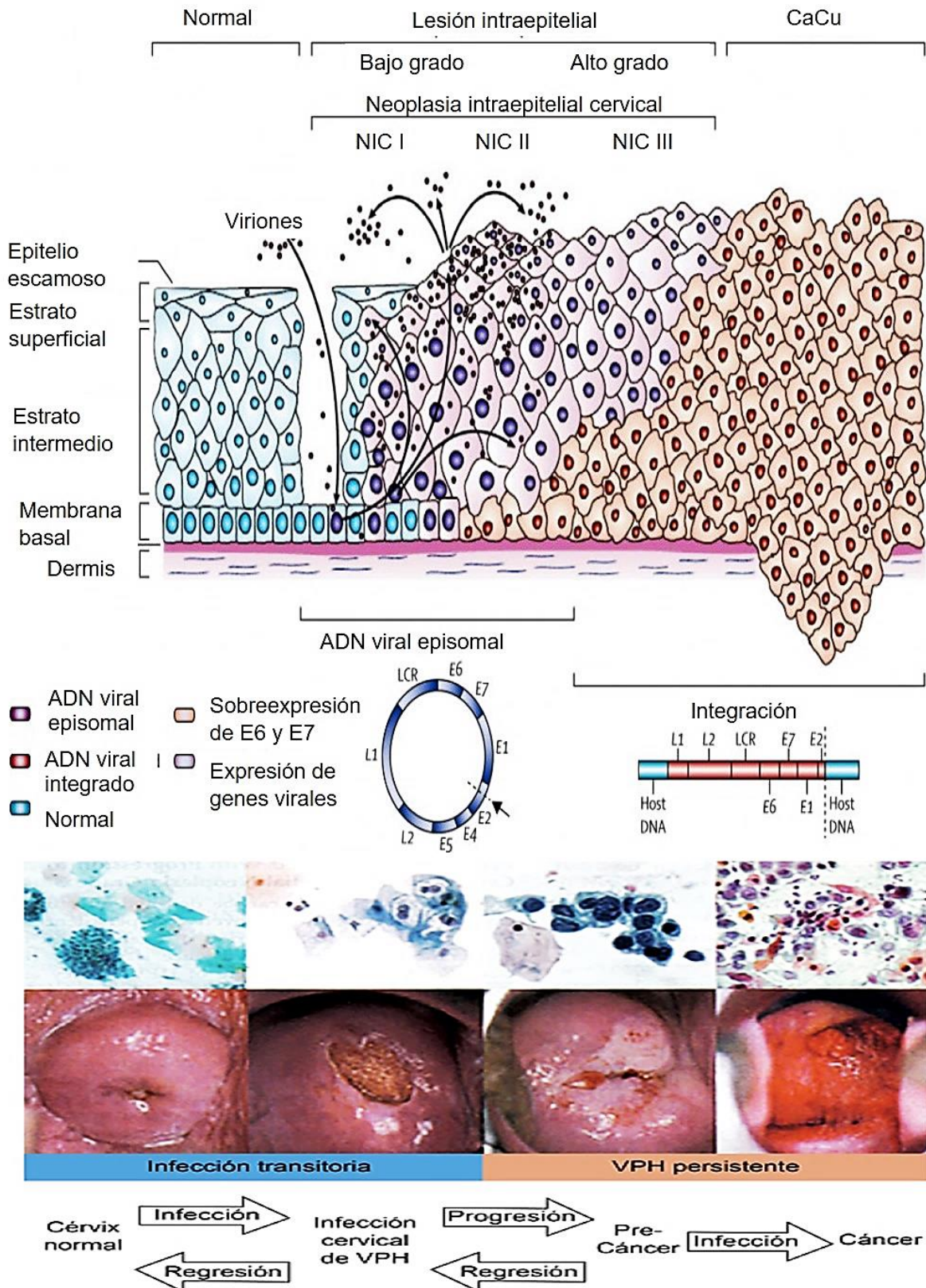


Figura 10. Historia natural del CaCu. Los pasos principales en la carcinogénesis cervical incluyen; 1) Infección del epitelio metaplásico de la zona de transformación cervical con uno o más VPH, en donde la infección puede ser eliminada de manera natural por el sistema inmune; 2) Persistencia viral en lugar de eliminación; 3) Integración del ADN viral al genoma humano, con sobre expresión de las oncoproteína E6 y E7, desencadenado en progresión clonal del epitelio infectado persistentemente a pre cáncer cervical; aún puede haber aclaramiento. 4) CaCu e invasión a órganos aledaños. Modificado de San José 2018; Crosbie 2013; Moscicki 2006.

5.6 Coinfecciones

La coinfección entre los tipos de VPH es común en mujeres, y hombres, aunque su importancia clínica sigue siendo controvertida, ya que se desconoce la epidemiología de las combinaciones de genotipos de VPH. Algunos estudios muestran que las infecciones múltiples del VPH aumentan el riesgo de la progresión de las lesiones y de CaCu (Ho GY 1998). Además, se asocia con una baja respuesta y tasa de supervivencia de pacientes con CaCu en estadios avanzados, que reciben radioterapia como tratamiento primario. (Bachtiary, *et al* 2002). Sin embargo, existen reportes en donde no encontraron evidencia de sinergia para el desarrollo de LIEAG en mujeres infectadas concomitantemente con múltiples genotipos de VPH (Wentzensen, *et al.* 2014). En tumores que están coinfectados de VPH 16 y 18, se demostró que el genoma del VPH 16 estaba con mayor frecuencia de manera episomal, lo que podría ser indicativo de competencia del VPH 16 y 18 por la integración en el ADN genómico de las células hospederas (Badaracco, *et al* 2002). Por lo que, no está claro si existe una diferencia en la persistencia del VPH, el potencial de transformación genómica viral o un mayor riesgo de incidencia o gravedad de la lesión precursora resultante de una coinfección (Trottier, *et al.* 2006).

Se ha observado que múltiples genotipos de VPH a menudo coexisten dentro del epitelio cervical, y con frecuencia se detectan en un mismo frotis diferentes grados lesión intraepitelial, ya que cada virus se asocia a diferentes regiones del tejido. Las lesiones cervicales múltiples dentro de una misma paciente pueden ser causadas por diferentes genotipos, y una lesión precancerosa causada por un genotipo cancerígeno específico puede estar rodeada de infecciones transitorias por VPH (Sherman, *et al.* 2003).

Las infecciones múltiples se han encontrado con mayor frecuencia en mujeres de entre 15 y 34 años en el pico de su actividad sexual, además se ha demostrado una asociación entre las múltiples infecciones positivas a VPH AR y lesiones cervicales o neoplasia (Schmitt, *et al.* 2013). En México se ha encontrado una alta tasa de coinfecciones en citologías sin alteraciones neoplásicas (63.6%), lesiones precursoras (60%) y CaCu (26.4%), siendo el genotipo 16 el más prevalente en coinfecciones, junto con los genotipos 62,51 y 84 en citologías sin alteraciones, mientras que con los VPH 18, 59 y 70 en lesiones precursoras, y 18, 39 y 70 en CaCu (Aguilar, *et al* 2015).

El genotipo 18 posee hasta 18 veces más probabilidad de generar infecciones concurrentes junto con los genotipos 39 y 45, donde estos 3 genotipos son de la especie alfa 7, mientras que el genotipo 16 se asociaba más al 58, al ser estos dos de la misma especie que es alfa 9 (Méndez *et al.* 2005; González *et al.* 2004).

La coinfección de células individuales con dos tipos del mismo patógeno es rara debido a la interferencia homóloga, el cual, es un fenómeno en donde una célula infectada con un tipo de virus específico no puede ser infectada por un segundo

virus. Se ha descrito como un mecanismo viral egoísta, que permite que un virus infecte una célula y se replique sin competencia. (Sloutskin, *et al.* 2104). Esta teoría ha sido demostrada con los genotipos 16 y 18, durante una coinfección, el VPH 16 puede bloquear o excluir al VPH 18 en la superficie celular, para que esta no ingrese a la célula. Esta exclusión se debe en parte a las diferencias en la proteína L2 de la cápside de los genotipos del VPH (Biryukov, *et al.* 2018).

Otros microorganismos pueden infectar el epitelio cervical como lo son *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *virus del herpes simple 1 y 2 (VHS)* y *el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)*, favoreciendo al VPH-AR en su replicación, persistencia de la infección, y aceleración del proceso carcinogénico (Zhao, *et al.* 2012).

5.7 Prevalencia de VPH-AR en México

A nivel mundial, VPH 16 y 18 contribuyen a más de los 70% de todos los casos de CaCu, entre el 41- 67 % de las lesiones cervicales de alto grado y 16-32% de las lesiones cervicales de bajo grado. Después de VPH 16 y 18 los 6 tipos de VPH-AR tienden a ser los mismos en todas las regiones del mundo, 31, 33,35, 45, 52, y 58, donde estos representan 20 % adicional de CaCu en todo el mundo. (IARC/ICO. 2019). Existen variaciones geográficas, sociales y culturales que determinan la prevalencia y distribución de VPH AR en citologías normales en todo el mundo, siendo África y América Latina las regiones con mayor prevalencia (20-30%), mientras que el sur este de Asia y el sur de Europa los de menor prevalencia (6-7%) (De Sanjosé, *et al.* 2007).

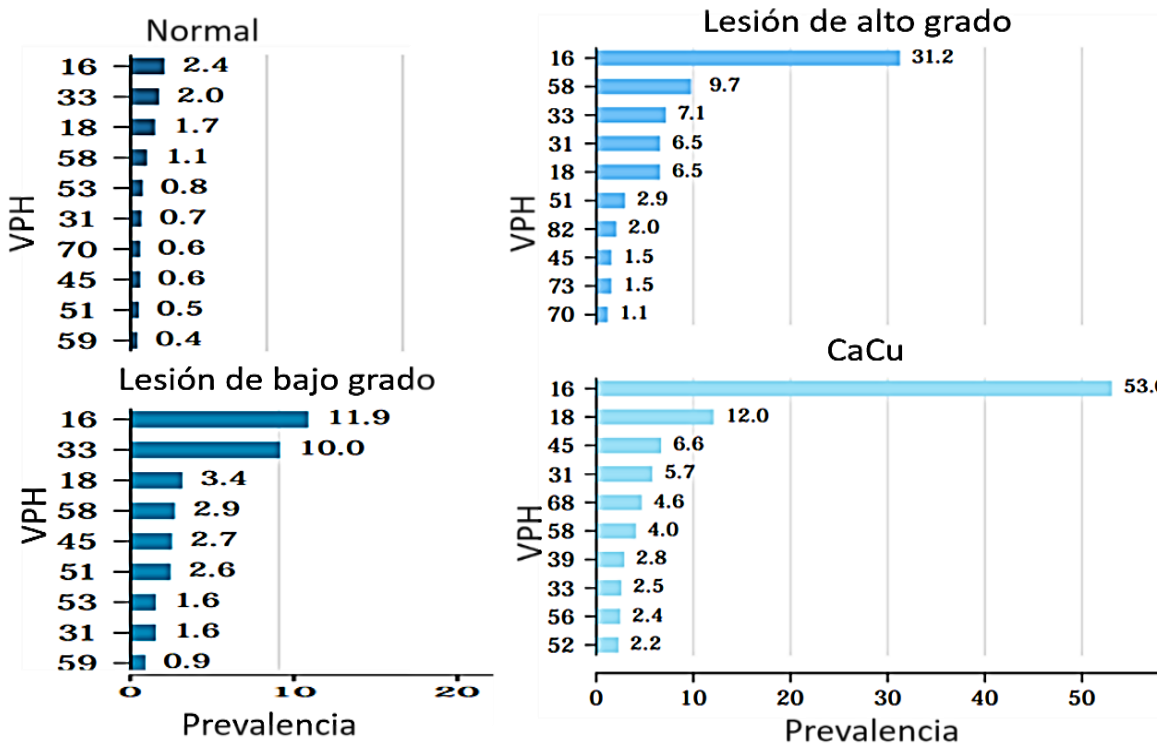


Figura 11. Comparación de los 10 VPH-AR presentes en muestras cervicovaginales de mujeres mexicanas con y sin lesiones cervicales. El genotipo 16 es el más frecuente en todos los casos. Recuperado de ICO/IARC 2019.

El CNEGSR es la única institución pública que posee datos actuales de tamizaje de CaCu, su último reporte fue del año 2017. Se realizó una recopilación bibliográfica que indica la prevalencia de VPH-AR, que varían del 4 al 40% en citologías sin alteraciones neoplásicas y del 30 al 94 % en lesiones precursoras, esta variación porcentual se debe a la población estudiada, así como, la sensibilidad del método utilizado.

Tabla 4. Prevalencia de VPH AR en lesiones precursoras y CaCu

Estado	Año	Población	Edad	Método	Displasia	% VPH	Referencia
Yucatán	2004	104	17-80	PCR MY09/11 y Sistema de hibridación	LIEBG	28 el 30.6% fue VPH 58, y 27% fue 16	González M, Rosado I, <i>et al</i>
		67			LIEAG	92, el 23.3% fue VPH 58, y 20% fue 16	
		15			CaCu	86, donde el 30.7% fue VPH 16	
CDMX	2006	95		PCR para región E6 y GP5/ GP6	LIEBG	57, el 25.3% fue VPH 16 y 5.6% fue 58	Piña P, Hernández D, <i>et al</i>
		65			LIEAG	88, el 42.4% fue VPH 16 y 18.3% fue 58	
		108			CaCu	92, el 72.2% fue VPH 16, y 4.6% fue 18	
Guerrero	2009	133	19-89	PCR GP5+/GP6	CaCu	100, donde el 66.7 % fue VPH 16 y 9% fue 18	Alarcón L, Illades B,
Guerrero	2010	784	15-97	PCR MY09/11, GP5/ GP6 y region E6	LIEBG	94.5, el 10 % fue VPH 16 y 13.4 % fue 33	Illades B, Alarcón L, <i>et al</i>
		91			LIEAG	83.5, el 27 % fue VPH 16 y 12 % fue 31	
		141			CaCu	100, donde el 68.1% fue VPH 16 y 8.5% fue 18	
Nacional (Meta-análisis)	2012	1,425	18-80	Búsqueda bibliográfica (12 artículos)	LIEBG	42, el 13.1 % fue VPH 16 y 7.4 % fue 33	Peralta R, Romero P, <i>et al</i>
		364			LIEAG	75.5, el 28.3 % fue VPH 16 y 4 % fue 18	
		499			CaCu	95, el 63 % fue VPH 16 y 8.6 % fue 18	
Ciudad de México	2014	462	18-69	PCR y secuenciación	CaCu	98.7, el 46.5% fue VPH 16 y 10% fue 18	Guardado M, Juárez E, <i>et al</i>
Nacional	2014	931		PCR e hibridación Linear Array®	LIEBG	77.3, el 22.1 % fue VPH 16 y 6.9 % fue 18	Salcedo M, Piña P, <i>et al</i>
		481			LIEAG	92.4, el 44.3 % fue VPH 16 y 7.7 % fue 31	
		524			CaCu	91, el 57 % fue VPH 16 y 6.9 % fue 18	
Monterrey, Jalisco CDMX	2015	315	18-70	PCR e hibridación Linear Array®	LIEBG	46, el 9.8 % fue VPH 16 y 6.8 % fue 58	Aguilar A., Vallejo V, <i>et al</i>
		30			LIEAG	76, el 40% fue VPH 16 y 16.7% fue 31	
		121			CaCu	100, el 62.8% fue VPH 16 y 11.6% fue 58	
Estado de México, CDMX	2019	65	18-88	PCR e hibridación Linear Array®	LIEBG	31, el 25% fue VPH 16 y 15% fue 31	Colín M, Domínguez, <i>et al</i>
		34			LIEAG	74, el 52% fue VPH 16 y 8% fue 39	

Tabla 5. Prevalencia de VPH-AR en citologías sin alteraciones neoplásicas

Estado	Año	Población	Edad	Método de detección	% VPH	Referencia
Morelos	2001	1340	18-80	Sistema de línea reversa	14.5	Lazcano E, Herrero R, <i>et al.</i>
Morelos	2005	274 mujeres embarazadas	15-39	Captura de híbridos	37.2	Hernández C, Smith J, <i>et al.</i>
CDMX	2006	313	18-60	PCR y secuenciación	12	Piña P, <i>et al.</i>
Nacional (Meta análisis)	2007	--	18-70	Búsqueda bibliográfica	20.4	De SanJosé, <i>et al.</i>
Guadalajara	2008	189	18-55	PCR	24	Montoya M, Rojo W, <i>et al.</i>
Guadalajara	2008	61 mujeres con artritis	18-55	PCR	30	Montoya M, Rojo W, <i>et al.</i>
Puebla (Metepec)	2009	326	17-70	PCR con primers específicos	25.4	Velázquez N, <i>et al.</i>
Guerrero (Acapulco)	2010	3,117	15-97	PCR MY09 / 11 y GP5 + / GP6	40.9	Illades B, Alarcón L, <i>et al.</i>
Guerrero (Acapulco)	2010	335	18-81	PCR	37.6	Colín O, García C, <i>et al.</i>
Michoacán (Lázaro Cárdenas)	2010	336	18-81	PCR	49.7	Colín O, García C. <i>et al.</i>
Tlaxcala	2010	236	15-60	PCR	31.3	Velázquez N, <i>et al.</i>
Norte y sur de México	2010	50,159	20-70	PCR	8.6	Lazcano E, <i>et al.</i>
Ciudad de México	2012	929	18-76	PCR	7.9	López R, Medel M, <i>et al.</i>
Nacional (Meta-análisis)	2012	6,418	18-80	Búsqueda bibliográfica	15	Peralta R, Romero P, <i>et al.</i>
CDMX, Puebla, Guadalajara	2015	356	--	PCR e hibridación Linear Array®	12.4	Aguilar A., Vallejo V, <i>et al.</i>
CDMX (ISSSTE)	2016	3,258	--	PCR	10.2	Martínez R, <i>et al.</i>
Valle de México	2017	142	20-80	PCR	9.0	Caballero H, <i>et al.</i>
Nacional	2017	--	---	---	10.3	CNEGSR
CDMX	2017	1,163	16-72	Captura de híbridos, y PCR de región E6	36	Gallegos J, Rivera, <i>et al.</i>
Monterrey	2017	339	18-70	PCR	7.0	Casillas, <i>et al.</i>
Tamaulipas	2018	7,597	18-69	PCR	4.2	Narváez F, <i>et al.</i>
Quintana Roo (Cozumel)	2018	1,187	20-70	PCR multiplex fHPV typing™	15.8	Navarro E, Hernández F, <i>et al.</i>
Nacional (ISSSTE)	2019	115,651	25-64	PCR COBAS 4800®	13	Torres K, Ruíz I, <i>et al.</i>
Estado de México, CDMX	2019	30	18-88	PCR e hibridación Linear Array®	13.3	Colín M, Domínguez, <i>et al.</i>
Nacional	2019	60,328	18-88	BD Onclarity HPV Assay® PCR de la región E6/E7	24.78	Campos A, <i>et al.</i>
Puebla	2019	4,640	18-88		25.26	
CDMX	2019	8,048	18-88		25.94	
Quintana Roo	2019	411	18-88		21.17	

5.8 Cofactores de riesgo

La infección por VPH-AR se considera una causa necesaria, pero no suficiente para el desarrollo de CaCu, al ser una enfermedad multifactorial, se requieren otros cofactores que se enlistan a continuación:

- Edad. En las mujeres jóvenes sexualmente activas (18-30), la infección es más común, y después de los 30 años decrece la prevalencia. Los casos de CaCu aumenta a partir de los 35 años, mostrando un pico en las mujeres de 50 a 60 años, representando hasta el 30% de los casos, lo que puede sugerir que la infección ocurre en edades tempranas y posee una progresión lenta a cáncer. (Adam *et al* 2000)
- Anticonceptivos orales: La LCR viral contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroides como la progesterona que es un componente activo de los anticonceptivos orales, por lo cual, se favorece la transcripción génica viral, así como, la integración del genoma viral. Se ha observado que el uso prolongado (5 a 9 años), de anticonceptivos orales incrementa hasta 4 veces el riesgo de desarrollar CaCu, en mujeres positivas a VPH-AR (Moreno, *et al* 2002).
- Número de parejas sexuales: La infección por VPH-AR se transmite por contacto sexual, por lo que la probabilidad de contraer VPH está estrechamente relacionada con el comportamiento sexual de la persona, así como el de su(s) pareja(s) sexual(es). A mayor número de parejas sexuales, mayor posibilidad de infección por VPH-AR (Burk, *et al.* 1996).
- Inmunodepresión: Produce la disminución a nivel cervical de linfocitos Natural Killer y linfocitos T CD4, e inversión del cociente CD4/CD8 (Delmas, 2000).
- Inicio de la vida sexual: La inmadurez cervical, las deficiencias de flujo cervical protector y la ectopia cervical aumentada, pueden conducir a una mayor susceptibilidad, para la adquisición de una infección por el VPH en mujeres adolescentes y adultas jóvenes (Adam *et al* 2000).
- Número de embarazos: Se ha reportado en México que más de 5 embarazos a término, tiene 14 veces más probabilidad del desarrollo de CaCu, que mujeres con menos de 2 embarazos, esto se debe al aumento en la concentración de hormonas, aumento en el número de traumas en el cérvix durante el parto, y la mayor persistencia de la zona de transformación exocervical (Piña, *et al* 2006).
- Tabaquismo: Al poseer hidrocarburos aromáticos, nitrosaminas y alquitrán tiene un efecto carcinogénico directo, además produce inmunosupresión del cuello uterino al generar una alteración de la inmunidad local, contribuyendo a permitir la persistencia de la infección por VPH-AR (Vaccarella, *et al* 2008).
- ETS: En pacientes con VIH/SIDA, la infección es más persistente que en pacientes sanas, por lo cual llegan a desarrollar lesiones en un tiempo 2 veces menor. Infección con VHS 2 produce de 2 a 9 mayor riesgo del desarrollo de CaCu (DiPaolo, *et al* 1998).
- Predisposición genética: Pacientes con el polimorfismo de p53 en el residuo 72 (Prolina por Arginina), produce mayor susceptibilidad de p53 para ser degradado por E6, así como 4 y 7 veces más probabilidad del desarrollo de LIEAG y CaCu (Piña P, 2010; Torres F, 2011).
- Duchas vaginales: Generan mayor probabilidad de infección persistente de VPH-AR, ya que produce cambios en la microbiota, y alteración de la inmunidad normal del cuello uterino (Bui, *et al* 2016).

5.9 Prevención primaria.

En México la vacuna contra el VPH, fue incorporada en la cartilla nacional de vacunación en el año 2008, destinada para las niñas en 5to de primaria. En el 2019 se aplicaron 310,000 dosis, aun así, la cobertura de aplicación de dicha vacuna no fue nacional (Secretaria de Salud, 2019).

Tabla 6. Vacunas preventivas contra VPH

Nombre	Adyuvante	Marca	Genotipos contra los que protege	Dosis	Aprobación FDA
Cervarix ®	AS04	GlaxoSmithKline	16 y 18	2	2009
Gardasil ®	Al ₂ PO ₄ OHSO ₄	Merck & Co	16, 18, 6, 11	3	2006
Gardasil9 ®	Al ₂ PO ₄ OHSO ₄	Merck & Co	16,18,31,33,45, 52, 58, 6, 11	3	2014

En países nórdicos la implementación de la vacuna Gardasil, generó protección continua durante al menos 10 años, además de reducir el número de casos de NIC 2 relacionado con VPH 16 y 18. En Australia la vacuna ayudo a disminuir hasta un 64% la prevalencia de los genotipos 16,18, 6 y 11, así como una posible protección cruzada contra otros genotipos de alto riesgo (Kjaer, *et al.* 2018).

5.10 Prevención secundaria

El objetivo de salud pública es reducir la incidencia y la prevalencia de CaCu, y la mortalidad asociada, impidiendo el avance de las lesiones precursoras hacia un cáncer invasor. Se utilizan herramientas de tamizaje (evaluación de una población sana susceptible a la enfermedad, para la detección temprana de dicha enfermedad). En México, tal como lo indica la NOM-014 SSA2 1994 modificada en el 2007, “Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer uterino”, el tamizaje de CaCu se ofrecerá a toda mujer entre 25 a 64 años de edad, y se basa principalmente en la prueba de Papanicolaou y la inspección visual con ácido acético cuando no se cuente con infraestructura para realizar el PAP, además, se pueden emplear como complemento pruebas biomoleculares de detección de VPH-AR. La observación de células de aspecto atípico y/o maligno en el PAP, se deberá realizar una remisión a una clínica de displasias, donde se le realizará a la paciente el estudio de colposcopia y la confirmación diagnóstica por estudio histopatológico. El tratamiento de LIEBG y LIEAG puede ser mediante electrocirugía o laserterapia, y en el caso de CaCu debe ser remitida a un centro oncológico para el tratamiento de acuerdo con el estadio de la enfermedad.

5.10.1 Papanicolaou (PAP) e Inspección visual de ácido acético (IVA)

El PAP no es una prueba diagnóstica confirmatoria sino una prueba diagnóstica presuntiva. Consiste en un análisis citológico de las células del cérvix para identificar cambios citológicos compatibles con lesiones precursoras de CaCu (ASCCP, 2014). El PAP ha tenido más éxito que ninguna otra prueba en la prevención de CaCu en los últimos 50 años, pero no es infalible, en México posee una sensibilidad menor al 80% y una especificidad menor del 65%, por lo que menos de la mitad de las muestras compatibles con lesiones precursoras son identificadas con esta prueba (Yunes *et al* 2015). Su baja sensibilidad y especificidad se debe a que requiere una muestra de alta calidad, y es altamente subjetiva al ojo humano, dependiendo de la experiencia observacional del patólogo. El PAP se considerará de diagnóstico tardío, ya se requiere visualizar alguna modificación celular (ACS, 2017).

La IVA permite detectar cambios tempranos en las células del cuello uterino a simple vista, tras la aplicación de ácido acético 3-5%. En el epitelio escamoso normal, ocurre poca coagulación en la capa de células superficiales, al haber poca actividad nuclear, aunque en las células más profundas contienen más proteínas nucleares, el ácido acético no penetra lo suficiente y, en consecuencia, la precipitación resultante no logra opacar el color del estroma subyacente. Las zonas de LIE y CaCu experimentan una coagulación máxima, debido a su mayor contenido de proteínas nucleares e impiden el paso de la luz a través del epitelio, como resultado, el epitelio toma un color blanco, por lo cual esta reacción se denomina acetoblanca (Sankaranarayanan, *et al.* 2005).

5.10.2 Detección molecular de VPH

En los programas de tamizaje de CaCu, la detección de VPH puede realizarse mediante la detección de ADN del genoma completo o una sección de ellos de algunos de los 13 tipos de VPH-AR, así como por una amplificación de un fragmento de ADN viral mediante la reacción PCR punto final o tiempo real (qPCR), con o sin genotipificación. Las pruebas de genotipificación permiten identificar los tipos virales de manera específica (generalmente el VPH 16 y 18). Posteriormente se desarrollaron pruebas para detección del ARN mensajero (ARNm) de E6 y/o E7 (OPS, 2016). Una de las primeras pruebas desarrolladas y de las más usadas a nivel mundial para la detección molecular VPH-AR como prueba de tamizaje para el CaCu, fue la prueba COBAS®.

5.10.2.1 COBAS 4800®

Es una prueba cualitativa automatizada para la detección de VPH-AR, clínicamente aprobada por la FDA para tamizaje de CaCu, posee una sensibilidad 97.3% y una especificidad 94.5 %. Por medio de PCR en tiempo real, identifica específicamente los genotipos 16 y 18, y al mismo tiempo detecta genéricamente 12 genotipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). Como control interno utiliza el gen de β -globina para la integridad, extracción y amplificación de la muestra (Roche 2018).

Para evitar resultados falsos negativos, las muestras negativas de VPH con un resultado negativo de β - globina se marcan como no válidas, y para reducir el riesgo de resultados falsos positivos posee la enzima AmpErase, que evita el arrastre de contaminación, al diferenciar los productos de amplificación del ADN objetivo (Roche 2018). El equipo puede realizar 96 pruebas en aproximadamente 5 horas. Consta del Cobas X [®] que realiza la extracción y purificación del ADN, el termociclador Cobas Z [®] que efectúa la *qPCR* usando primers específicos para la región L1 del VPH (amplicon de 150pb) y del gen de β globina (amplicon de 330pb), y el software necesario para el procesamiento de los datos. La técnica no presenta reactividad cruzada con genotipos de bajo riesgo como 6 y 11 (Roche 2018).

Por las limitaciones que posee el PAP y la IVA, es fundamental generar que la detección molecular de VPH-AR, sea implementada en el sector de salud pública como prueba primaria de tamizaje, junto con el PAP. La combinación del PAP y la detección molecular, generan un alto valor predictivo negativo, y la tasa de falsos negativos es solo del 10% (Taejong *et al*, 2019). En Australia dicha implementación genero la disminución de hasta un 36% de la incidencia de CaCu, y representa un ahorro económico ya que al tener en 2 ocasiones consecutivas un resultado negativo en ambas pruebas genera que la paciente se le realice la prueba después de 5 años (Lew, *et al* 2017)

Una vez detectada la presencia VPH-AR, es necesario realizar otro tipo de pruebas para conocer si la infección ya causó lesiones precursoras, lo que significaría una infección persistente, o si aún no se presentan alteraciones celulares compatibles con lesiones, lo cual haría pensar que es una infección reciente o transitoria, por lo que es fundamental que antes de remitir a una paciente al estudio de colposcopia se haga una prueba adicional para complementar la clasificación de pacientes dependiendo en sus necesidades terapéuticas (triage) (Apas, *et al* 2016). Un triage positivo identifica a un subgrupo de la población positiva para la prueba primaria de tamizaje, que deberá ser derivado a la prueba diagnóstica, en este caso la colposcopia y examen histopatológico, por su particular riesgo de desarrollar CaCu. Por el contrario, las pacientes con un triage negativo, tienen un riesgo inferior de desarrollar la enfermedad, por lo que no requieren una derivación a colposcopia inmediata (Apas, *et al* 2016). Al derivar a colposcopia exclusivamente a las pacientes con un riesgo real de padecer CaCu, se genera reducir el número de colposcopias innecesarias, bajar la carga del sector salud, poder atender a un mayor número de pacientes, y disminuir la incidencia de CaCu. Las opciones de triage más empleadas en la actualidad es la detección por inmunocitoquímica de *p16* y *Ki67*, y el PAP cuando el tamizaje primario sea la detección molecular de VPH-AR (Wentzensen, *et al* 2015; Arbyn *et al* 2006).

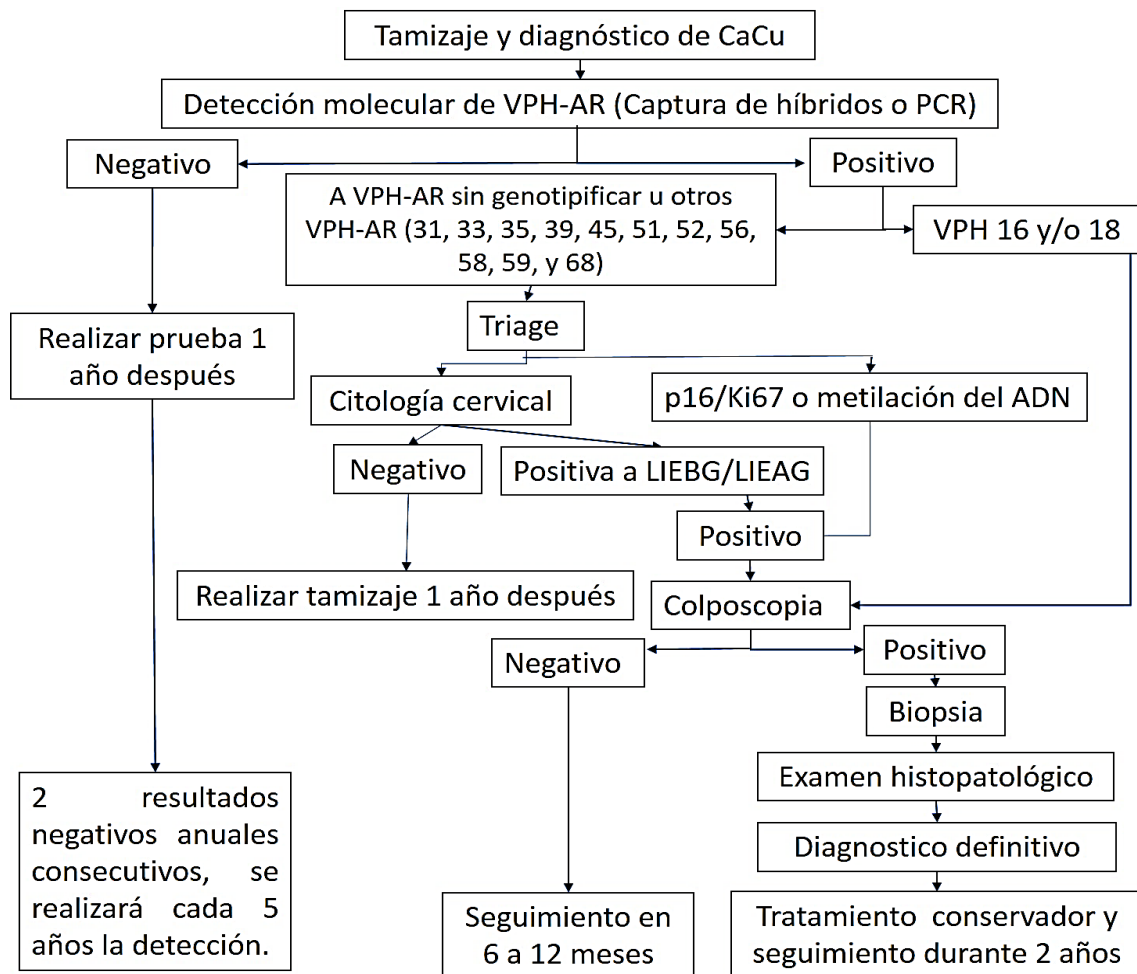


Figura 12. Algoritmo de tamizaje y diagnóstico de CaCu. La detección molecular de VPH-AR debe ser implementada como método primario de tamizaje. Un resultado negativo de VPH-AR requiere evaluación un año después. En el caso que posea alguno de los otros 12 genotipos de alto riesgo se requiere revisar si hay anomalías celulares cervicales o realizar otra prueba complementaria para complementar el triage. Un resultado positivo a VPH 16 o 18 o a la prueba de triage se debe solicitar realizar colposcopia, y biopsia para la confirmación diagnóstica por examen histopatológico. Modificado de ASCCP 2014; Wentzensen *et al* 2016.

5.10.3 TRIAGE

p16 es una proteína con 148 aminoácidos, un peso molecular de 16 kDa, y con 4 repeticiones de anquirina. Es codificada por el gen *CDKN2A* situado en el cromosoma 9p2 (Nava, *et al* 2014). En epitelio normal *CDK4/6* se une a la ciclina D1 y forma un complejo proteico activo, que fosforila a *pRb*, en este estado se disocia de *E2F*, promoviendo la transcripción de genes diana que son esenciales para la transición de la fase G1 a S, entre dichos genes se encuentra *CDKN2A*, aumentando los niveles de *p16*, el cual inhibe al complejo *CDK4/6/Ciclina D1*, por lo que *p16* regula el ciclo celular en las células normales. En el epitelio infectado por VPH-AR, E7 se une a *pRb*, por lo que *E2F* puede inducir el ciclo celular, y unirse al promotor *CDKN2A* generando la sobreexpresión de *p16*, por lo cual, constituye un buen candidato a marcador de proliferación neoplásica. El ciclo celular de la célula infectada por VPH-AR no es dependiente del complejo ciclina D/*CDK4-6* (Nava, *et al* 2014).

La detección de la sobreexpresión de *p16* se realiza por inmunohistoquímica en citologías cervicales, o biopsias cervicales incluidos en parafina. Identifica a mujeres positivas a VPH-AR con LIEAG, y no se asocia a LIEBG (Carozzi, *et al.* 2013). Una de las desventajas, es que también se sobreexpresa en lesiones de cérvix no asociadas a la infección por VPH (Li J, *et al.* 2000).

Ki67 es una proteína nuclear de 359 KDa, está codificada por el gen *MKI67* en el cromosoma 10q25. Puede ser detectada en el núcleo de células en proliferación, en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), pero no en células inactivas ya que está ausente en fase G0. Evita que los cromosomas colapsen en una sola masa de cromatina formando una barrera de carga estérica y electrostática; la proteína tiene una alta carga eléctrica neta y actúa como un surfactante, dispersa los cromosomas, y permite la motilidad cromosómica independiente, se relaciona con la transcripción de ARN ribosómico, ya que la inactivación de *Ki67* conduce a la inhibición de la síntesis de ARN ribosómico (Cuylen, *et al.* 2016). *Ki67* se expresa en la capa supra basal del epitelio estratificado del cérvix uterino normal, pero su expresión es mayor en las alteraciones de la maduración epitelial, e incrementa conforme al grado de displasia. La progresión tumoral se asocia a un aumento de proliferación celular, por lo que la expresión de *Ki67* constituye un potencial indicador pronóstico en las lesiones precursoras del cérvix en etapas tempranas de la enfermedad (Zartuche, *et al.* 2013).

La tinción dual de *p16* y *Ki67*, es comercializada como CINTEC® PLUS Kit, e identifica específicamente LIEAG. La expresión simultánea de *p16* y *Ki67* en una misma célula es signo inequívoco de haber sido transformada por la infección por VPH-AR, reduciendo significativamente la variabilidad inter observador en la lectura citológica, ayudando a reducir significativamente el número de mujeres derivadas para colposcopia confirmatoria (Comino, *et al.* 2015; ROCHE 2018).

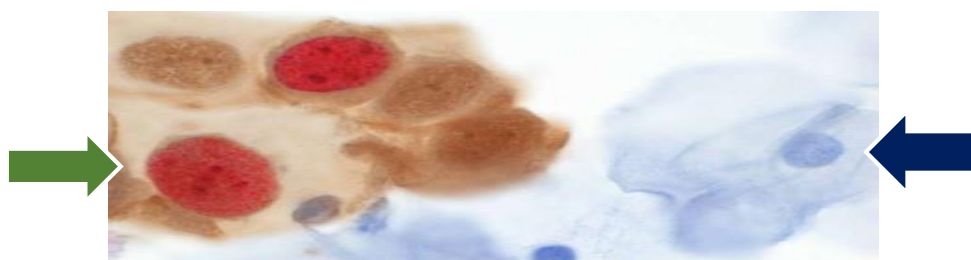


Figura 13. Tinción dual *p16* y *Ki 67* en células de cérvix. La fecha de color verde señala a la célula positiva a *p16* (café) y a *Ki67* (rojo), indica un proceso de transformación maligna a causa de VPH-AR. La fecha de color azul indica una célula no infectada. Recuperado de ROCHE 2018

Otras estrategias de triage incluyen la metilación del ADN y la expresión de las oncoproteínas E6 y E7. La cuantificación del ARNm de E6 y E7, posee mayor especificidad y valor predictivo positivo que el PAP, para la detección de lesiones de alto grado (Pierry, *et al.* 2011), además de que las mujeres positivas a E6 tienen mayor probabilidad de poseer una infección persistente y por ende a desarrollar cáncer (Tota *et al.* 2017).

En relación a la metilación del ADN del hospedero, se ha observado un aumento de la metilación de los genes del huésped en mujeres con infecciones transformantes y cáncer en comparación con aquellas con una infección transitoria de VPH-AR, *in vitro* la metilación del ADN puede diferir entre los genes, pero en todos los casos los niveles de metilación aumentan durante la transformación, afectando principalmente a los genes supresores de tumores, además se encontró que los patrones de metilación eran en su mayoría independientes del tipo del VPH-AR (Schütze, et al 2015). *CADM1*, *MAL* y *miR-124-2*, muestran un aumento en los niveles de metilación, proporcionalmente al grado de la lesión y la duración de la enfermedad cervical (Bierkens, et al 2013). La metilación de *EPB41L3* fue un mejor marcador de lesiones de alto grado en comparación con la metilación de los genes *EDNRB*, *LMX1*, *DPYS*, *MAL* y *CADM1* (Vasiljević, et al 2014). Al evaluar la metilación de *PAX1* y *SOX1* en combinación con el PAP, da un mayor rendimiento para la detección de LIEAG, en comparación del uso de captura de híbridos para la detección de VPH-AR en conjunto con el PAP (Lai et al., 2014). La hipermetilación de islas CpG no es uniforme durante el desarrollo de lesiones precursoras, por lo que se desarrolló un modelo de clasificación que involucra 5 sitios CpG de los genes *SOX1*, *ONECUT1*, *PAX1*, *NKX6-1* y *LMX1A*, el cual ayuda a definir a las pacientes con lesiones precursoras de bajo y alto grado (Tian, et al 2015).

Se ha demostrado que hay un estado diferencial de metilación de alrededor de 27000 islas CpG, entre muestras cervicales con y sin alteraciones neoplásicas, además se encontró que hay islas CpG de riesgo que se asocian a genes relacionados con el CaCu, incluyendo *SOX1*, *DCC*, *HOXC10*, *MYOD1*, *TWIST1*, *SFRP4*, *CALCA*, *CXCR4*, y *WT1*, sin embargo, solo *HOXC10* tenía su sitio CpG de riesgo ubicado dentro de los 200 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Teschendorff, et al 2012). En queratinocitos transfectados con VPH 16 y 18, se encontró que el VPH-AR impone un perfil de hipermetilación en las bandas cromosómicas en donde están los clústers *HOX A* y *HOX D*, mientras que en el clúster *HOX C* se encontró un perfil de hipometilación (Leonard, et al 2012). La hipermetilación de los *loci* de *HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXD4* y *HOXD12* se asocian clínicamente con la mala respuesta a tratamiento en etapas IIB y IIIB localmente avanzadas de CaCu, y a una sobrevida menor de las pacientes (Rios,2015). Estas últimas observaciones denotan que el VPH-AR impone cambios en los perfiles de metilación del ADN de la familia *HOX*, y por consiguiente en su expresión. Los genes *HOX* al ser factores de transcripción necesarios para la morfogénesis, la diferenciación, proliferación, y apoptosis, poseen un papel fundamental en el proceso carcinogénico al ser modificados epigenéticamente (Tschopp, et al 2012), por ende, podrían ser aplicados como marcadores tanto en lesiones precursoras como opción de triage, así como de progresión, sobrevida y pronóstico en CaCu.

5.11 Genes HOX

Los genes *HOX* son genes maestros de control del desarrollo, actúan en la parte superior de las jerarquías genéticas, regulan aspectos de la morfogénesis, la diferenciación celular, proliferación y apoptosis. Contienen un elemento de secuencia común de 180 pb, llamada homeobox, que se descubrió por primera vez en *Drosophila*, posteriormente, se demostró que se presenta en los tres reinos de organismos multicelulares. El homeobox codifica un homeodominio de 61 aminoácidos, que es el responsable de la unión a secuencias específicas del ADN (Figura 17). Las proteínas *HOX* son reguladores transcripcionales, es decir activan o reprimen la expresión de genes diana, al reconocer una secuencia consenso *TAAT*, y la asociación con cofactores *MEIS* y *PBX*, por lo que no son efectores, sino modulan a nivel transcripcional los genes blanco río arriba de las vías de señalización (Mark, et al 1997; Mallo, et al 2008)

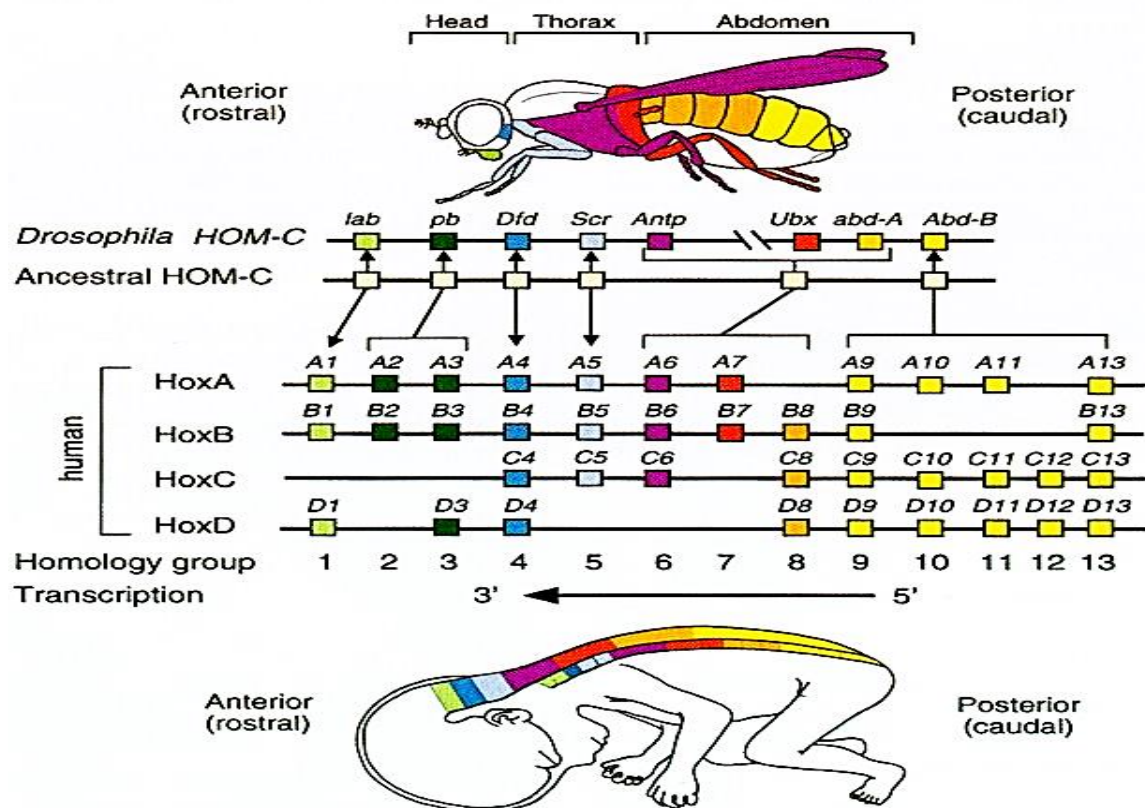


Figura 14. Organización genómica y patrones de expresión colineal de genes *Drosophila HOM* y genes *HOX* de mamíferos. Representación del complejo homeótico *Drosophila* (*HOM-C*), los cuatro cluster *HOX* humanos, y un hipotético complejo homeótico ancestral, que muestra sus posibles relaciones filogenéticas. Cada gen está representado por un cuadro de color. Los dominios de expresión de los genes *HOM/HOX* se esquematizan en una mosca y las prevertebras de un feto humano. Los números del 1 al 13 indican los genes parálogos identificados hasta el momento. Recuperado de Mark 1997 y Kmita 2003.

Han sido identificados en mamíferos 39 genes *HOX* y clasificados en cuatro grupos denominados A, B, C y D (Figura 16). Estos genes se localizan en los humanos, en las regiones cromosómicas 7p15.3, 17q21.3, 12q13.3 y 2q31, respectivamente. Cada grupo contiene entre 9 y 11 genes alineados en 13

grupos parálogos de acuerdo con la similitud de sus secuencias nucleotídica y aminoacídica y su posición dentro del cromosoma (Mark, *et al.* 1997).

Los genes localizados el extremo 3' del *cluster* se expresan primero, y dirigen la diferenciación y morfogénesis de las regiones anteriores del cuerpo, en contraste los genes del extremo 5', se expresan tardíamente y dirigen la diferenciación de las zonas posteriores del embrión, este proceso se denomina principio de colinearidad temporal y espacial (Kmita, *et al* 2003).

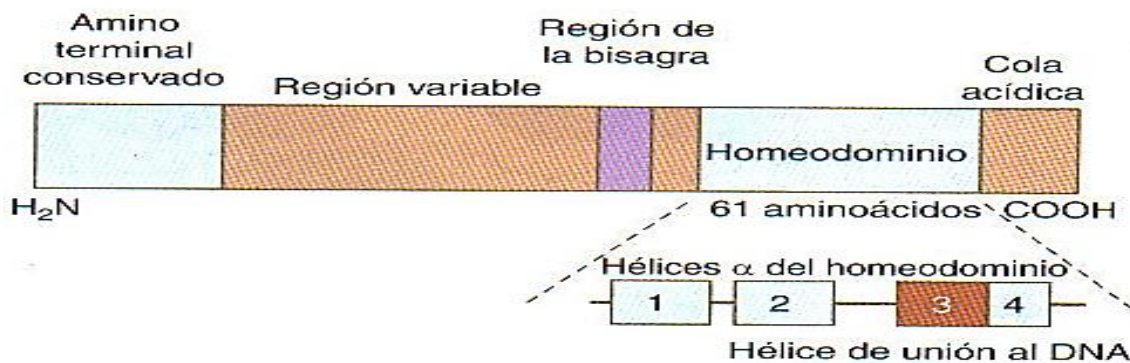


Figura 15. Estructura de una proteína HOX. Está dividido en 4 regiones: a) Carboxilo terminal compuesto de aminoácidos ácidos; b) Homeodominio de unión al ADN, formado por 3 alfa hélices, que contactan con surco el menor y mayor del ADN; c) Dominio variable, se encuentra el motivo de unión a TALE que reconoce a los cofactores *PBX* y *MEIS*; d) Dominio amino terminal que genera contactos adicionales al ADN. Recuperado de UAZ 2016.

Se ha demostrado que los genes *HOX* poseen una relación directa con el cáncer, al tener funciones oncogénicas o supresoras de tumores, dependiendo del microambiente, del tipo de tumor, y de los mecanismos de regulación de transcripcional (metilación del ADN, remodelación de la cromatina, modificaciones de las histonas, y ARNs no codificantes) (Tschopp, *et al* 2012). Los genes *HOX* pueden controlar la expresión génica directamente (como reguladores transcripcionales), o indirectamente (a través del control epigenético). De hecho, se demostró que las proteínas *HOX* están involucradas en distintos mecanismos epigenéticos relacionados con la metilación del ADN y las histonas, lo que puede conectarlas con la regulación epigenética de un gran número de genes involucrados en la progresión del cáncer (Paco, *et al* 2019).

Existen pocos estudios en donde se relacione a los genes *HOX* y el CaCu, los cuales han demostrado que la expresión de las proteínas *HOXB2* y *HOXB13* aumenta durante el progreso del CaCu (González, *et al* 2015). La sobreexpresión de la proteína *HOXB4*, se asocia a la infección por VPH-AR en lesiones precursoras y en CaCu (Barba, *et al* 2012). *HOXA9* se subexpresa en CaCu y su restauración disminuye la proliferación, la migración y la expresión de genes de transición epitelial a mesenquimal (Alvarado, *et al* 2016). *HOXA1*, *B2*, *B4*, *C5*, *C10* y *D13* podrían estar involucrados en el proceso que conduce a la transformación de las células cervicales normales a causa del VPH-AR (Hung, *et al* 2003). La expresión de los genes *HOXB2*, *HOXB4* y *HOXB13* se encontró solo en CaCu pero no en tejido cervical normal (López, *et al* 2006).

En relación con la expresión del *cluster HOXC*, se ha demostrado que *HOXC 5* y *8* están relacionados con el proceso de transformación oncogénica para el desarrollo de CaCu (Alami, *et al* 1999). *HOXC6* y *C10* están sobre expresados en carcinomas cervicales invasores comparados con queratinocitos cervicales normales (Santin *et al* 2005). La sobreexpresión de *HOXC10* en CaCu se asoció con la invasión en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Zhai, *et al.*, 2007).

La expresión de *novus* de *HOXC9*, *C11*, *C12* y *C13* ha sido reportada en cáncer cervical *in situ* e invasor (López, *et al* 2006). Sin embargo, hay pocos estudios relacionados con *HOXC11* en el desarrollo de CaCu y sus lesiones precursoras, así como de cambios en etapas iniciales de la infección por VPH-AR.

5.11.1 HOXC 11

Es miembro del grupo *HOXC*, que se localiza en el cromosoma 12q13.13, posee 2 exones y un intrón intermedio, el dominio *HOX* se encuentra en el segundo exón. La proteína posee 304 aminoácidos con un homeodominio de 56 aa de largo, que abarca del aa 233 al 289, consta de 3 alfa hélices (Atlas Genetics Oncology 2019).

HOXC11 es un factor de transcripción, que forma parte de un sistema regulador del desarrollo embrionario, proporciona a las células identidades posicionales específicas en el eje anterior-posterior, por lo que posee un papel importante en el desarrollo de múltiples tejidos y estructuras en la región caudal del embrión, que incluye: especificación neuronal, formación de vértebras, desarrollo de extremidades posteriores y organogénesis, particularmente la formación de los riñones y los órganos reproductivos. En el embrión de ratón en desarrollo el ARNm de *HOXC11* se encuentra en la región más posterior a partir de los 9.5 días de gestación (Hostikka., *et al* 1998). Se une a un elemento promotor del gen de la lactasa-florizina hidrolasa. Se ha demostrado que *HOXC11* se expresa en tejidos adultos, incluidos riñón, músculo esquelético, testículos, piel, e intestino delgado (GEPIA, 2020).

HOXC11 estimula la diferenciación, supervivencia y la proliferación de células progenitoras durante el desarrollo embrionario normal; sin embargo, se ha demostrado que cuando se expresa fuera de contexto promueven aberrantemente la proliferación, contribuyendo al proceso carcinogénico, por lo cual, está estrechamente relacionado con diversos tipos de cáncer incluyendo al de cérvix, pulmón, mama y renal (Sun, *et al* 2019; Liu, *et al* 2015; McIlroy M, *et al* 2010). La sobreexpresión de *HOXC11* se asocia a un mal pronóstico, y demostró promover la proliferación de células renales cancerosas (Liu, *et al* 2015).

En cáncer de células pequeñas de pulmón, *HOXC11* colabora con el *microARN-1197* para regular positivamente la proliferación y la migración celular (Sun, *et al* 2019). En carcinoma de células claras de riñón y adenocarcinoma de colón, la sobreexpresión de *HOXC11* se relaciona con una baja supervivencia general,

además *in vitro* su inhibición promueve la apoptosis y reprime la proliferación celular, posiblemente al estar involucrado en la regulación negativa de las vías relacionados con el receptor activado por proliferadores peroxisomales (*PPAR*), indispensables en la modulación de funciones críticas de la homeostasis fisiológica celular, como el metabolismo de ácidos grasos y glucosa, diferenciación celular, y proliferación. Aunque el papel específico y el mecanismo preciso de *HOXC11* en la iniciación y progresión de estos dos tumores malignos tienen que ser más ampliamente explorado (Cui, *et al* 2020).

La interacción de *HOXC11* y el coactivador de receptor de esteroides 1 (*SRC-1*) regulan la resistencia a la terapia endocrina basada en tamoxifeno e inhibidores de la aromatasa, en cáncer de mama positivo para el receptor de estrógeno, al regular positivamente a la proteína *S100 beta*, la cual participa en la progresión y diferenciación del ciclo celular. *HOXC11* y *SRC-1* son factores predictivos de mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, y los niveles séricos de *S100β* ayudan a monitorear la respuesta continua a la terapia endocrina. Además, las pacientes con cáncer de mama resistente a terapia endocrina con *S100β* elevado pueden beneficiarse del tratamiento combinado de inhibidor endocrino y tirosina quinasa (McIlroy M, *et al* 2010).

HOXC 11 aumenta su expresión a causa de regulación epigenética modulada por la oncoproteína E7 del VPH-AR, sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que demuestren específicamente el papel de *HOXC 11* para el desarrollo y progresión de CaCu (Sharma, *et al* 2017).

El *loci* de *HOXC11* se encuentra consistentemente hipometilado y posiblemente activo en las muestras de pacientes con CaCu en etapas localmente avanzadas (IIB y IIIB), que presentaron clínicamente mala respuesta al tratamiento de radioterapia y radioterapia más cisplatino, e hipermetilado en algunas muestras con buena respuesta al tratamiento (Ríos, 2015).

Respecto a su expresión, no se han encontrado diferencias significativas en la expresión de ARNm de *HOXC11*, entre muestras sin lesión intraepitelial positivas a VPH 16 y muestras negativas a VPH-AR, mientras que en muestras de CaCu está constantemente sobre expresado (Sharma, *et al* 2017). La expresión de *novo* de *HOXC11* ha sido reportada en CaCu invasor, lo que indicaría que la sobreexpresión de este transcrito podría ser esencial para el desarrollo de CaCu (López, *et al* 2006). La sobre expresión de ARNm de *HOXC11* en CaCu está posiblemente asociado con una supervivencia general desfavorable, así como una mortalidad mayor, por lo cual la expresión de *HOXC11*, así como de *HOXA1*, *HOXA5*, y *HOXA6* podrían actuar como marcadores de pronóstico en CaCu (Eoh, 2017). En cultivos primarios de queratinocitos, se demostró que la expresión de la oncoproteína E7 del VPH del genotipo 16, produjo que aumentaran los niveles de ARNm de *HOXC11* (McLaughlin, *et al* 2011).

Al evaluar el estado de la metilación de las histonas del promotor de *HOXC11* en la línea C33A transfectado con VPH16-E7, se encontró que había presencia simultánea de las marcas *H3K4me3* y *H3K27me3*, pero un mayor enriquecimiento de las marcas *H3K4me3* en comparación con *H3K27me3*, lo que indica la progresión hacia la activación del gen (Sharma, *et al* 2017). Este cambio en las marcas de metilación en las histonas se debe a la desregulación epigenética a causa de la oncoproteína E7 del VPH-AR, que a pesar de que induce una mayor expresión de *EZH2* del complejo represivo polycomb 2, hay pérdida concomitante de la actividad de *EZH2* a través de la fosforilación de este en la Serina 21, mediada por la vía *AKT*. Además, se produce la inducción transcripcional de dos desmetilasas de histonas *KDM6A* y *KDM6B* (McLaughlin, *et al* 2011).

5.12 Gen *EZH2*

El gen *EZH2* se localiza en el cromosoma 7q36.1, transcribe para una enzima metil-transferasa, que es el componente catalítico del complejo represivo *polycomb 2* (*PRC 2*). *PRC2* está implicado principalmente en el mantenimiento de la represión transcripcional de determinados genes, está constituido por *EED*, *SUZ12*, *RbAp48 / 46* y *EZH2*. El dominio SET ubicado en el carboxilo terminal de *EZH2*, cataliza la transferencia de grupos metilo de un donante de metilo universal, S-adenosil- L- metionina, al átomo de nitrógeno de la cadena lateral de la lisina 27 de la histona 3, formando S-adenosil- L-homocisteína y N-metil-L-Lisina como productos, la trimetilación de esta histona es una modificación que conduce a la condensación de la cromatina (Holland, *et al.* 2008; Liu *et al* 2015).

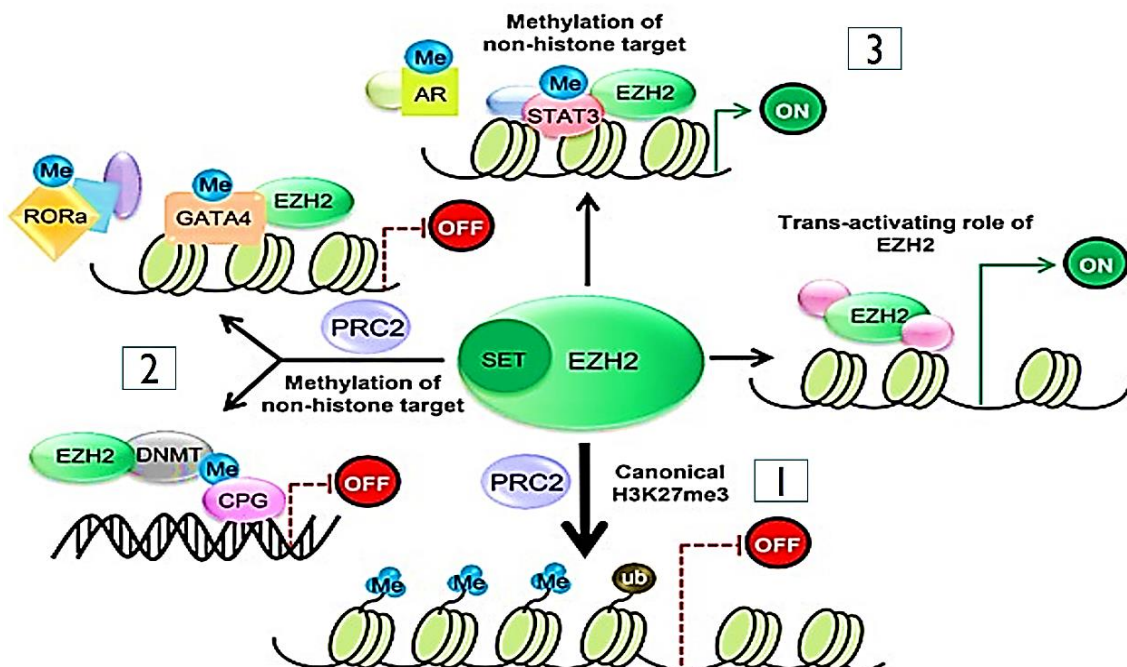


Figura 16. Mecanismos de acción de *EZH2*. 1) *EZH2* trimetila la histona 3 en la lisina 27, induciendo silenciamiento transcripcional. 2) Metilación de sustratos proteicos no histonas (*GATA4*, *DNMTs* y *RORα*) generando activación o silenciamiento. 3) Actúa como un activador transcripcional; al metilar los factores/co-factores de transcripción (*STAT3*, *β-catenina*, *AR* y *ERα*), y al ser fosforilado *EZH2* en la Serina 21 por la vía *AKT*. Recuperado de Wen 2017.

La marca H3K27me3 es reconocido por las proteínas *CBX* (*Chromobox*) del complejo *PRC1*, el cual cataliza, a través de las proteínas Ring, la ubiquitinación de la histona *H2AK119*, que tiene el efecto de compactar la cromatina y reprimir la transcripción (Blackledge, et al 2014). *H3K27me3* juega un papel importante en el silenciamiento de genes epigenéticos, particularmente en *loci* de genes *HOX*, durante el desarrollo embrionario y la vida postnatal, aunque también juegan un papel crítico en silenciar el locus de *CDKN2A* que codifica los genes supresores de tumores *p16* y *p14* (Kotake, et al. 2009). En células jóvenes en proliferación, la evasión de la senescencia requiere la represión de *CDKN2A*, que está mediada por la marca H3K27me3 (Nitya, et al. 2018). De acuerdo con esto, la expresión de *EZH2* es alta en las células en proliferación, pero está regulada negativamente en las células estresadas y senescentes. La sobreexpresión de *EZH2* contribuye a la oncogénesis al silenciar de manera inapropiada los genes supresores de tumores (Wu, et al. 2011). La transcripción del gen *EZH2* está regulada por la vía *pRB-E2F*, y alcanza su punto máximo en la transición de fase G₁ a S. (Wu, et al. 2011).

EZH2 está regulado a nivel transcripcional y postranscripcional, ya que la degradación de su ARNm puede ser dirigida por *miR-101*, *miR-26a*, *miR-138*, *miR-124*, *miR-98*, y *miR-214* cuya expresión disminuye durante la progresión del cáncer (Wu, et al. 2011). *HOTAIR* es un ARN largo no codificante, que se transcribe del grupo de genes *HOXC*, y se une el complejo represivo *PCR 2* a través de *SUZ12*, generando la supresión de la transcripción de los genes *HOXD*, por medio de *H3K27me3*, y la desmetilación espontánea de H3K4 (Spizzo, et al 2012). Se han demostrado que *HOTAIR* y *EZH2* son factores para el desarrollo de CaCu, metástasis y mal pronóstico, induciendo el silenciamiento de genes que influyen en la dinámica de la cromatina (Gupta, et al 2010).

Se han descrito alteraciones en *EZH2* o en el complejo *Trithorax SWI / SNF*, que antagoniza la función polycomb por medio de la trimetilación del residuo 4 de lisina en la histona 3, en cáncer de mama, ovario, próstata, y cervicouterino (Nitya, et al. 2018). En la célula cancerosa *EZH2* regula negativamente la expresión de genes supresores de tumores como *GSK-3 β* , *RAD51* y *p53*, al aumentar los niveles de *H3K27me3*, y regula positivamente oncogenes como *STAT3* y *NOTCH1*, al metilar cofactores transcripción, además *EZH2* promueve la supervivencia y proliferación de células cancerosas, aumenta la inestabilidad genómica e inhibe la diferenciación celular (Christofides, et al. 2016). En cáncer de mama la expresión de *EZH2* es elevada en carcinoma in situ y cáncer invasor, pero casi indetectable en muestras de mama normales (Ding., et al 2006), así como aumento en la agresividad tumoral y mala respuesta a los tratamientos (Hinz, et al 2009).

Se ha demostrado que VPH-AR produce la sobreexpresión de *EZH2*, sin embargo, no resulta en una mayor actividad del *PRC2*, ya que se ha observado disminución de las marcas *H3K27me3* en algunos genes, esto debido a que dicha sobreexpresión favorece la formación de *PCR4*, un complejo que contiene la isoforma *Eed 2*, causando la desacetilación y metilación de la histona *H1K26* (Kuzmichev, *et al* 2005)

EZH2 también puede participar como un coactivador transcripcional, al inhibir su actividad enzimática cuando es fosforilado directa o indirectamente por la vía *PI3K- AKT* en la Serina 21 (*EZH2p-S21*), esto se ha observado en diversos tipos de cáncer. En cáncer de próstata *EZH2p-S21* aumenta la expresión del receptor de andrógenos (Jin-zhi, *et al.* 2014). Se ha informado que *EZH2p S21* aumenta la proliferación *in vitro* y la actividad oncogénica *in vivo* (Cha T, *et al* 2005).

Se ha demostrado que en CaCu la oncoproteína *E7* del VPH 16 interactúa directamente con las vías responsables de la transcripción de *EZH2* positivamente. *E7* induce la actividad de *AKT* al fosforilarlo en dos sitios clave (treonina 308 y serina 473), en este estado produce la activación *mTOR*, que al ser una quinasa específica de serina/treonina desempeña un papel clave en múltiples procesos celulares, incluida la apoptosis y la proliferación celular. (Sarbasov, *et al* 2005). *E7* se puede unir directamente a *DNMT1*, ocasionando cambios conformacionales que producen la exposición del sitio activo, generando aumento en la metilación del ADN (Burgers, *et al* 2007).

En células infectadas por VPH 16 y 18 con sobreexpresión de *E7*, se producen altas concentraciones de *EZH2p-S21*, junto con niveles elevados de las desmetilasas de histonas, lisina desmetilasa 6A (*KDM6A*) y la lisina desmetilasa 6B (*KDM6B*), que convierten *H3K27me3* en las formas dimetiladas o monometiladas y disminución de la proteína *BMI1* del complejo Polycomb 1, estos cambios pueden explicar colectivamente la pérdida del porcentaje de *H3K27me3* observado *in vitro* e *in vivo*, así como para la reprogramación epigenética de genes *HOX* dirigidos a *H3K27me3* (Hylan P, *et al* 2011).

La sobreexpresión de *EZH2* y *EZH2p-S21*, en etapas localmente avanzadas de CaCu favorece la proliferación, migración e invasión, por lo cual posee un valor pronóstico desfavorable en las pacientes, asociado a un incremento en la mortalidad (Liu *et al* 2014). Sin embargo, en etapas iniciales de la transformación son pocos los estudios hasta ahora descritos.

La interferencia de la expresión de *EZH2* resultó en una inhibición de la proliferación y aumento de la apoptosis en las células HeLa, lo cual muestra que *EZH2* tiene un papel en la regulación de la apoptosis en las células de CaCu. Al comparar la expresión proteica de *EZH2* de biopsias de tejido normal, CaCu, y LIEAG, se encontró una correlación entre la expresión de *E7* y *EZH2*, sin embargo, no se encontró una correlación directa entre los niveles de proteína *EZH2* y el grado de malignidad de las lesiones (Holland *et al* 2008).

Son varias las evidencias *in vitro* sobre la desregulación de *EZH2* y de genes blanco como *HOXC11*, sin embargo, son pocos los estudios *in vivo* donde se analiza esta relación en etapas tempranas de la transformación

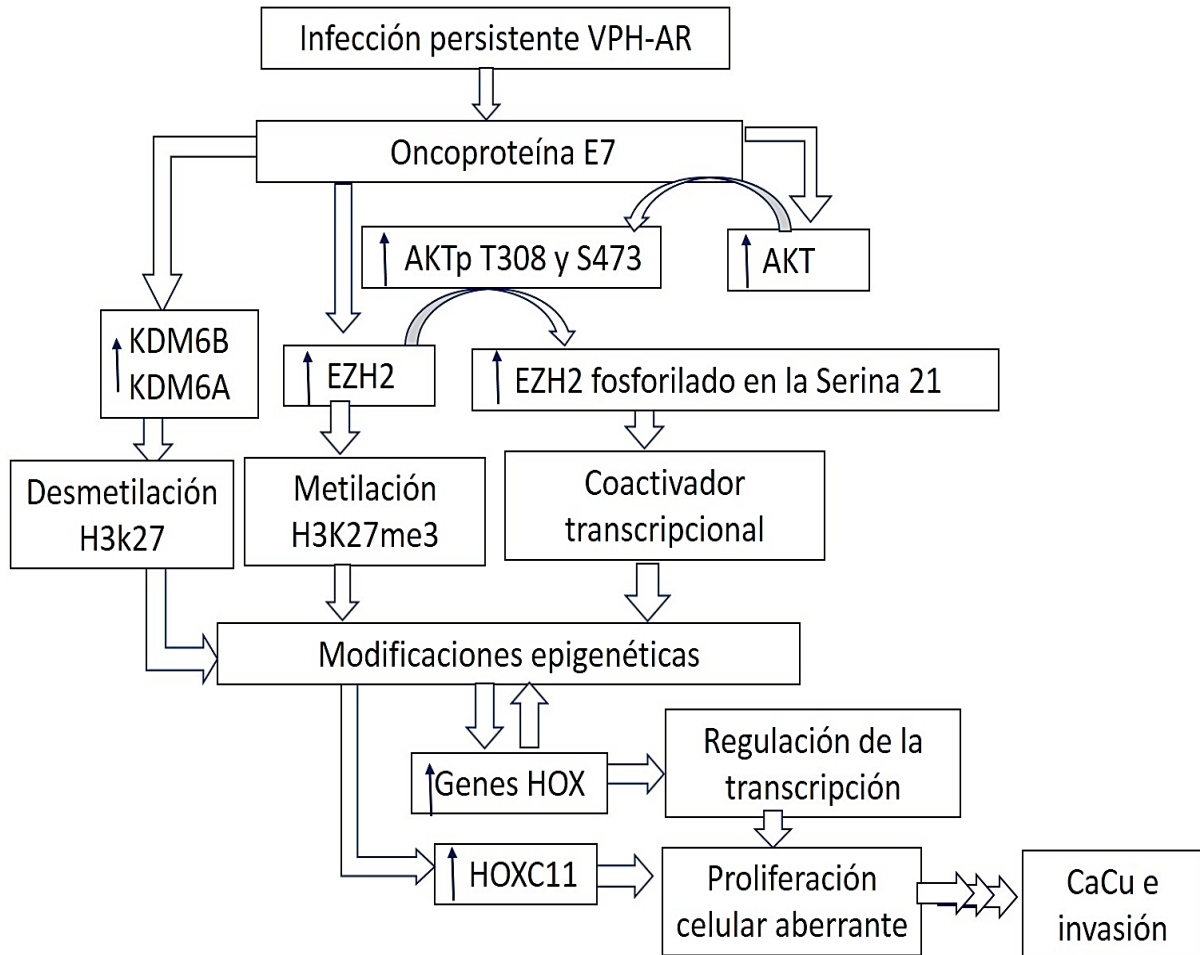


Figura 17. Modificaciones epigenéticas por la oncoproteína E7 del VPH-AR. La sobreexpresión de E7, altera múltiples eventos moleculares impulsando la carcinogénesis, y junto con otras vías desencadena CaCu. E7 favorece la sobre expresión de *EZH2pS21*, *EZH2*, *DNMT1* y *KDM6A/B*, generando reprogramación epigenética en la célula huésped, favoreciendo el silenciamiento o activación génica. Los genes *HOX* adquieren funciones oncogénicas. La sobreexpresión de *HOXC11* favorece la proliferación aberrante y resistencia a la apoptosis, así como resistencia a fármacos (Holland *et al* 2008; McLaughlin *et al* 2011; Hyland *et al* 2011)

6. Justificación

Diversos estudios han descrito diferencias en la prevalencia de VPH-AR que oscilan entre 4 a 50% en citologías sin alteraciones neoplásicas y del 30 al 94 % en lesiones precursoras de CaCu. Sin embargo, estas diferencias pueden deberse a la sensibilidad de la técnica usada o a diferencias relacionadas a aspectos de la población en particular. Por otra parte, son pocos los trabajos que abordan este tema en muestras de pacientes referidas a la clínica de displasias. Por lo que, en este estudio se describirán la prevalencia de VPH-AR en cinco poblaciones; dos de la Megalópolis de México (CDMX y Puebla), dos de la península de Yucatán (Yucatán y Quintana Roo), y uno del suroeste del país (Guerrero), analizadas bajo la misma técnica de detección; así como la asociación de los cofactores de riesgo de esta enfermedad y las infecciones múltiples de VPH-AR.

Por otra parte, dentro de los cambios en el proceso de transformación a causa del VPH AR se ha identificado entre otros, la coexpresión de *p16* y *Ki-67*, la cual actualmente es usada como marcador de triage para identificar pacientes con lesiones precursoras. En CaCu se han descrito un gran número de alteraciones moleculares, algunas de las cuáles son evaluadas para determinar si dicha alteración se encuentra en etapas iniciales de la infección por VPH-AR y del desarrollo del CaCu y su posible uso como marcadores de triage. Se ha descrito que dentro de las alteraciones que existen en CaCu se encuentra la sobreexpresión de algunos miembros de la familia de factores de transcripción *HOX*. Sin embargo, son pocos los estudios sobre las alteraciones en la expresión de estos genes en etapas iniciales de la infección. La enzima metiltransferasa *EZH2*, la cual es sobre expresada por la presencia de la oncoproteína *E7* del VPH-AR, tiene la facultad de imponer marcas de metilación en histonas para la regulación transcripcional de genes blanco, para su silenciamiento o expresión. Dentro del conjunto de genes que puede regular, se encuentra la familia de factores de transcripción *HOX*. El incremento de expresión de *HOXC11* se ha asociado a la proliferación aberrante, invasión y al mal pronóstico en cáncer Cervicouterino. En estudios previos en el Laboratorio de Oncología Molecular, se ha identificado que el promotor de *HOXC11* es hipometilado en muestras de CaCu de pacientes con mala respuesta a terapia.

Sin embargo, a la fecha, no se ha descrito el perfil de expresión de *HOXC11* y de *EZH2pS21* en etapas iniciales de la infección (VPH-AR+) y la transformación (*P16+/Ki-67+*) por VPH de alto riesgo (VPH-AR). Por lo cual en el presente trabajo se analizará la expresión de *EZH2pS21* y *HOXC11* en etapas iniciales de la infección y transformación del epitelio cervical.

7. Hipótesis

Existen diferencias en la prevalencia de VPH-AR y en los factores de riesgo en distintas poblaciones de México.

EZH2p-S21 y *HOXC11* están sobre expresados en lesiones asociadas a infección persistente de VPH-AR, pero no en citologías cervicovaginales negativas a VPH-AR.

8. Objetivos

8.1 General

Identificar en muestras cervicovaginales provenientes del programa de tamizaje y de clínicas de displasias, la prevalencia de VPH-AR y los cambios en la expresión de *HOXC11* y *EZH2*.

8.2 Particulares

- 1) Identificar las características clínicas y frecuencia de VPH-AR en muestras de tamizaje y displasia
- 2) Determinar si existen diferencias en la prevalencia de VPH y factores de riesgo en pacientes del programa de tamizaje en las poblaciones estudiadas.
- 3) Determinar si existen diferencias en la prevalencia de VPH y factores de riesgo en pacientes procedentes de clínica de displasias en las poblaciones estudiadas.
- 4) Identificar los cambios de expresión en *HOXC11* y *EZH2* en muestras cervicovaginales positivas a VPH-AR.

9. Materiales y métodos

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Oncología Molecular, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO), ubicado en el edificio de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

9.1 Población de estudio

Previamente se recolectaron y procesaron 2780 muestras cervicovaginales, distribuidas de la siguiente manera, 1074 muestras de mujeres que acuden a clínica de displasias de la Ciudad de México (UMAE Gineco-obstetricia 4), Yucatán, Quintana Roo, Guerrero y Puebla, además, 1706 muestras de mujeres que acuden al programa de tamizaje de CaCu, de la Ciudad de México (SPPSTIMSS del Hospital de Oncología, UMF1, SPPSTIMS del Hospital la Raza), Puebla, Quintana Roo (UMF 14 Cancún), y Guerrero. Para la toma de muestras, las pacientes firmaron un consentimiento informado y llenaron una hoja de datos clínicos, bajo el protocolo “Nuevas estrategias moleculares para el tamizaje de Cáncer Cervicouterino: Importancia de la genotipificación y participación de las coinfecciones en la progresión” con número de registro R-2016-785-026, a cargo de la Dra Patricia Piña Sánchez.

Los objetivos planteados en este proyecto, los cuáles incluyeron el análisis de datos generados previamente, selección de muestras y determinación de los cambios de expresión de HOXC11 y EZH2 se realizaron bajo el protocolo *Validación de biomarcadores asociados al desarrollo y pronóstico de neoplasias atribuidas a la infección del virus del papiloma humano* con número de registro R-2017-3602-31 con apoyo financiero de Fondos Sectoriales CONACyT 2017 con número de registro 290427.

9.2 Criterios de selección

9.2.1 Criterios de Inclusión

- Mujeres mayores de edad de nacionalidad mexicana, que radiquen en el país, que estén afiliadas al IMSS, y que acudan por su libre albedrío al programa de tamizaje de CaCu, o que hayan sido referidas a clínicas de displasias.
- Consentimiento informado firmado y hojas de datos clínicos llena.

9.2.2 Criterios de exclusión

- Mujeres embarazadas, inmunocomprometidas, con alguna neoplasia.

9.2.3 Criterios de eliminación

- Muestras que no cumpla con la calidad analítica, ausencia del consentimiento informado firmado y hoja de datos clínicos.

9.3 Proceso de trabajo

Detección y genotipificación de VPH-AR

Se recolectaron y procesaron las muestras cervicovaginales por medio de toma ginecológica en medios de 20mL *PreserCyt*®, constituidos por 40-60% de agua, y 40-60% de metanol. Se introdujo el vial completo sin cepillo al equipo Cobas X 480® de ROCHE, en donde la muestra se digirió bajo desnaturalización, y luego fue lisada en presencia del reactivo caotrópico. Los ácidos nucleicos del VPH-AR son liberados, junto con el ADN genómico, que posee el gen β -globina el cual funciona como control interno, se purificaron a través de adsorción a partículas magnéticas de vidrio, lavadas y finalmente separadas de estas partículas, preparándolas para la amplificación y detección por PCR.

En equipo Cobaz Z 480 de ROCHE® se realizó la qPCR, empleando cebadores para amplificar la región polimórfica L1 del VPH de genotipos de alto riesgo 16,18, y otros (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). Las sondas de oligonucleótidos fluorescentes, se unen a regiones polimórficas dentro de la secuencia definida por estos cebadores, sirviendo como indicador e inhibidor. Un par de cebadores y una sonda adicionales se dirigen al gen de la β -globina humana (amplificación de 330 pb) para proporcionar un control de proceso.

Se procesaron los datos en el sistema de control del equipo, para obtener el resultado, como positivo o negativo, así como, si es genotipo 16,18, u otro de alto riesgo (Figura 18).



Figura 18. Sistema de flujo de trabajo del equipo COBAS 4800®

Detección de p16 y Ki67

Se realizó citología de base líquida con el equipo CellSolutions F50 ®, con 0.5 a 1 mL de muestra ginecológica aforado a 5 mL con medio de conservación PreservCyt ®. Para realizar la detección de p16 y Ki-67 mediante en ensayo CINTEC Plus de Ventana ®.

Cabe mencionar que los procedimientos anteriormente descritos fueron realizados previamente por el equipo del laboratorio de Oncología Molecular y los resultados generados fueron analizados como parte de los objetivos del presente trabajo, así como para la selección de muestras donde se evaluó la expresión de HOXC11 y EZH2

Inmunocitoquímica

Se emplearon 2 líneas celulares de CaCu (Caski y SiHa) como control positivo para estandarizar los anticuerpos HOXC11 y EZH2pS21. Se seleccionaron un total de 40 muestras distribuidas 10 negativas a VPH-AR (control), y 30 positivas a VPH-AR (15 positivas a p16/Ki67 y 15 negativas a p16/Ki67).

Se tomó una alícuota de 200 µL de muestra citológica, se centrifugó a 15,000 gravedades durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y lavó con 500 µL de PBS 1x estéril, se centrifugó nuevamente, y se repitieron los lavados 2 veces más.

Del botón celular se tomó una alícuota de 3-5 µL, se extendió sobre una laminilla electro cargada, se dejó secar al aire libre durante 30 min y se fijó con alcohol al 96°.En una laminilla se colocaron 6 muestras y un control positivo.

Los anticuerpos y diluciones óptimas utilizadas fueron, anti-HOXC11 monoclonal 1:100 (Santa Cruz ®, sc:81293), y de EZH2 fosforilado en la serina 21 policlonal 1:200 (abcam ®, 84989)

Para este procedimiento se empleó el kit Master Polymer Plus (Peroxidase), de Master Diagnostica ®.

Se realizó el desenmascaramiento antigénico con buffer de Citrato 1X pH=6.0 para el anticuerpo anti-HOXC11, y buffer de Tris-EDTA 1x pH=8 para el anticuerpo anti-EZH2p-S21, durante 20 min a 95°C.

Se aplicó sobre la citología 100 µL de la solución bloqueadora de la peroxidasa, se incubó 30 min tapado de la luz y agitación constante, a temperatura ambiente (TA), al terminar la incubación se lavó 3 veces con TBS-Tween 20 durante 5 min. Se añadió 100 µL del anticuerpo diluido, se incubó 30 min a TA, se lavó 3 veces con TBS-Tween 20 durante 5 min. Se adicionó sobre las muestras 100 µL del Polymer mix HRP, cubierto de la luz durante 30 min a TA, se lavó 3 veces con TBS-Tween 20 durante 5 min. Se mezcló una gota de DAB Chromogen Concentrate en 1 mL de DAB Substrate Buffer, y se aplicó la solución resultante sobre el tejido; se incubó 10 min a TA, se lavó 3 veces con TBS-Tween 20 durante 5 min.

Se tiñó con Hematoxilina durante 10 segundos, se enjuagó en agua corriente y carbonato de litio durante 1 min. Se deshidrató utilizando un tren de alcoholes de 10 minutos de alcohol 96°, 10 minutos alcohol absoluto y 10 minutos en xilol. Se montó con medio de montaje de resina.

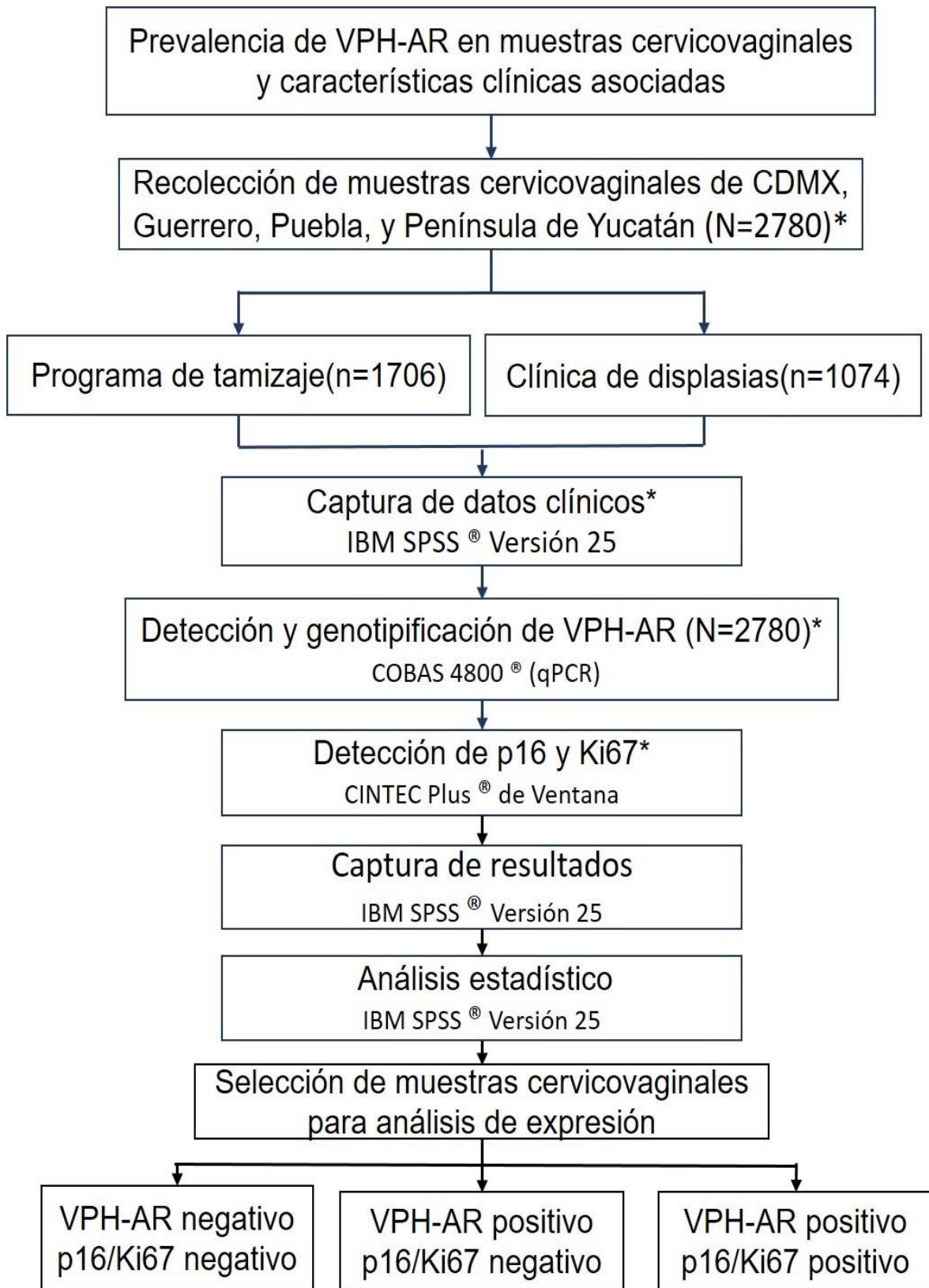
Análisis de imágenes

Se observaron al microscopio óptico con un aumento de 400x las inmunocitoquímicas, se tomaron 6 fotografías por campo de cada una de las muestras, se analizó la intensidad de la reacción con lo cual se determinó el porcentaje de expresión proteica nuclear como negativa/baja, y moderada/alta, utilizando el software Image J ® (Image processing and analysis in Java).

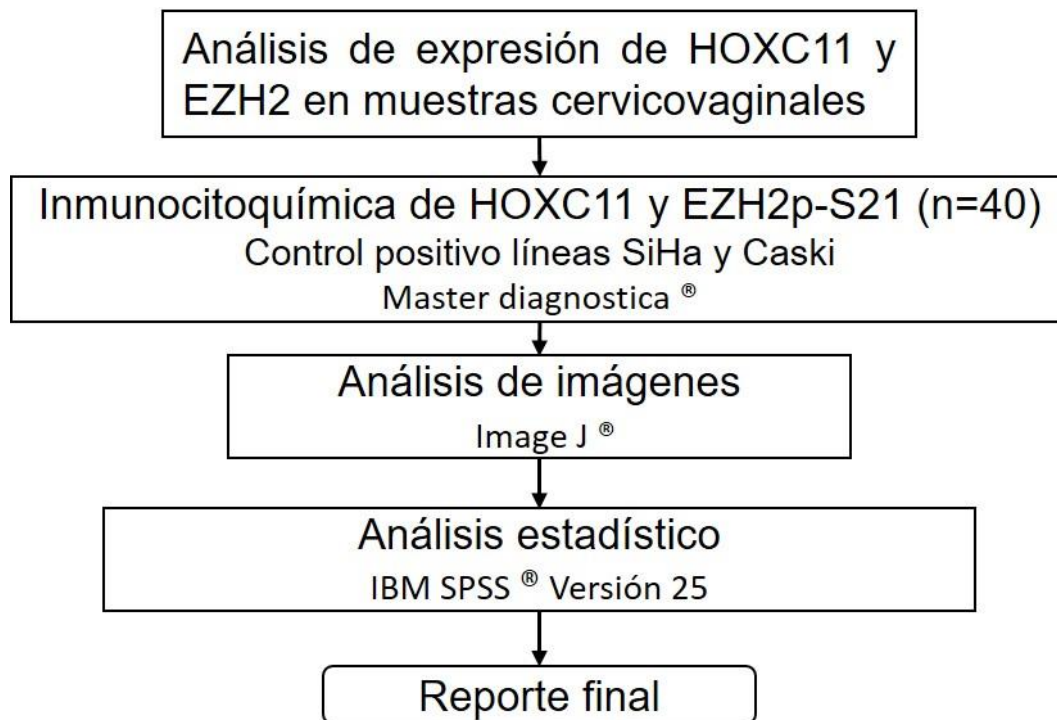
Análisis de datos

Empleando el paquete de datos IBM SPSS ®, versión 25.0, se realizó el análisis de estadístico descriptivo de la expresión proteica, así como de las características clínicas y sociodemográficas de las pacientes de este estudio, así mismo, para determinar si existen diferencias significativas, entre las pruebas y las poblaciones se utilizó la prueba de *chi* cuadrada ($p < 0.05$).

9.4 Diagrama de flujo



* Procedimientos previamente realizados por el equipo del laboratorio de Oncología Molecular



10. Resultados

10.1 Características clínicas y frecuencia de VPH-AR en muestras de tamizaje y displasia

Se analizaron un total de 2780 muestras provenientes de programa de tamizaje y de la clínica de displasias, de las cuales 806 fueron positivas a VPH-AR (29%). La media de edad fue de 40.5 ± 11.4 , la edad de inicio de vida sexual (IVS) fueron en promedio 19.1 ± 3.8 , la edad de menstruación 12.5 ± 1.6 ; número de parejas sexuales 2.5 ± 2.1 ; número de embarazos 2.4 ± 1.8 .

De las muestras analizadas, 1706 provenían del programa de tamizaje y 1074 de la clínica de displasias. En relación a las pacientes que acuden al programa de tamizaje, la media de edad fue de $39.9.5 \pm 10.7$, la edad de inicio de vida sexual fueron en promedio 19.4 ± 3.9 , la edad de menstruación 12.5 ± 1.6 ; número de parejas sexuales 2.8 ± 2.2 ; número de embarazos 2.2 ± 1.6 . En las pacientes provenientes de la clínica de displasias, la media de edad fue de 41.6 ± 12.5 , la edad de inicio de vida sexual (IVS) fueron en promedio 18.7 ± 3.6 , la edad de menstruación 12.6 ± 1.6 ; número de parejas sexuales 2.1 ± 1.9 ; número de embarazos 2.8 ± 2.1 . En la tabla 8 se muestran las frecuencias de VPH-AR y características clínicas en las muestras según grupo de procedencia: programa de tamizaje y clínica de displasias.

Tabla 7. Características clínicas y presencia de VPH en la población analizada

	TAMIZAJE		DISPLASIA		p
	n	%	n	%	
VPH-AR					
Positivo	380	22.3	426	39.7	0.00001
Negativo	1326	77.7	648	60.3	
VPH-AR positivo					0.00001
VPH 16	33	8.7	56	13.1	
VPH 18	16	4.2	12	2.8	
OTROS VPH-AR	295	77.6	296	69.5	
VPH 16 y 18	1	0.3	1	0.2	
VPH 16 y otro AR	19	5.0	45	10.6	
VPH 18 y otro AR	14	3.7	12	2.8	
VPH 16, 18 y otro	2	0.5	4	1	
Grupo de edad					0.00003
<24	102	6.2	63	6.8	
25-29	215	13.0	109	11.8	
30-39	522	31.5	255	27.7	
40-49	503	30.4	242	26.3	
50+	315	19.0	252	27.4	
Total	1657	100	921	100	
IVS					0.00015
≤18	796	50.3	470	58.5	
≥19	787	49.7	334	41.5	
Parejas sexuales					0.00001
1	458	29.4	373	47.6	
2	406	26.1	185	23.6	
3	320	20.6	123	15.7	
≥4	373	24	102	13	
Total	1557	100	783	100	
Número de embarazos					0.00001
0	223	14.1	88	10.4	
1	291	18.4	121	14.3	
2	457	28.9	194	22.9	
3	344	21.8	203	24.0	
≥4	266	16.8	241	28.5	
Número de partos					0.00001
0	744	47.4	277	32.9	
1	293	18.7	133	15.8	
2	279	17.8	159	18.9	
3	166	10.6	136	16.1	
≥4	88	5.6	138	16.4	
Tabaquismo					0.306
Si	341	23	164	20.5	
No	1144	77	636	79.5	
Alcoholismo					0.00001
Si	375	27.7	79	10.6	
No	980	72.3	663	89.4	
Uso de anticonceptivo					0.485
Si	1127	72	591	71.8	
No	438	28	231	28.2	
Anticonceptivo que usa					0.00001
Condón	220	19.6	112	19.3	
Hormonal	146	13.0	69	11.9	
DIU	249	22.3	89	15.3	
Salpingoclasia	433	38.7	261	44.9	
Otro	71	6.4	50	8.6	

Presencia de VPH y su relación con características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden al programa de tamizaje

Se evaluaron las características clínicas de las pacientes que acuden al programa de tamizaje dependiendo del resultado de la prueba de VPH-AR (Anexo 1), mediante la prueba de *chi* cuadrada se demostró que hay una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el resultado de VPH-AR y las características clínicas: grupo de edad, edad de inicio de vida sexual, número de parejas sexuales, número de embarazos.

El grupo de edad menor o igual a 24 años 34.3% (n=35) fueron positivas a VPH-AR, en el grupo de 25 a 29 años 38.6% fueron positivas (n=83). A partir de los 30 años, se observó que conforme avanza la edad disminuye el porcentaje de casos positivos a VPH-AR, teniendo en el grupo mayor de 50 solo 13.7% positivas a VPH-AR (Figura 19).

En cuestión a la edad de inicio de vida sexual, 796 pacientes indicaron haber comenzado su vida sexual a los 18 años o antes, de las cuales, 26.6% fueron positivas a VPH-AR, en contraste, las mujeres que indicaron haber comenzado su vida sexual después de los 19 años (n=787), solo 18.9% fueron positivas a VPH-AR (Figura 20)

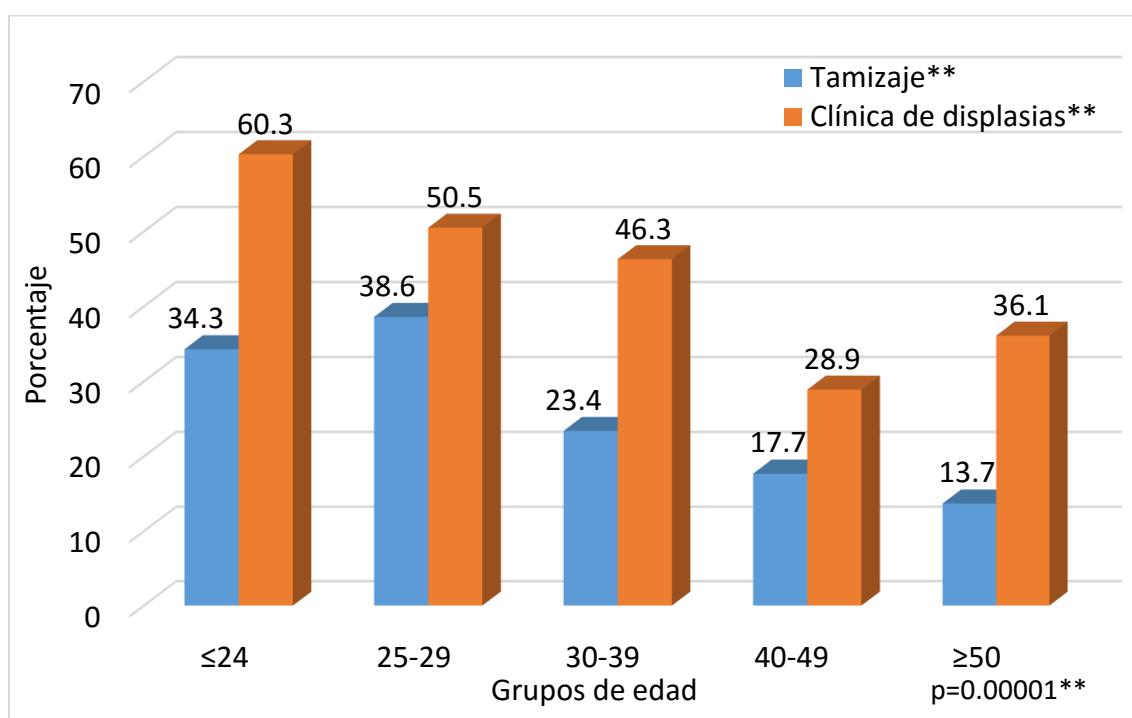


Figura 19. Prevalencia de casos positivos a VPH-AR por grupo de edad. En el programa de tamizaje el mayor porcentaje de casos positivos fue en el grupo de edad de 25-29, después disminuyó el porcentaje de casos positivos conforme avanzó el grupo de edad. En clínica de displasias el grupo de 24 años o menos presentó la mayor prevalencia de casos positivos, después en los siguientes grupos disminuyó el porcentaje, con excepción del grupo de mayores de 50 años en donde se presentó nuevamente un aumento del porcentaje.

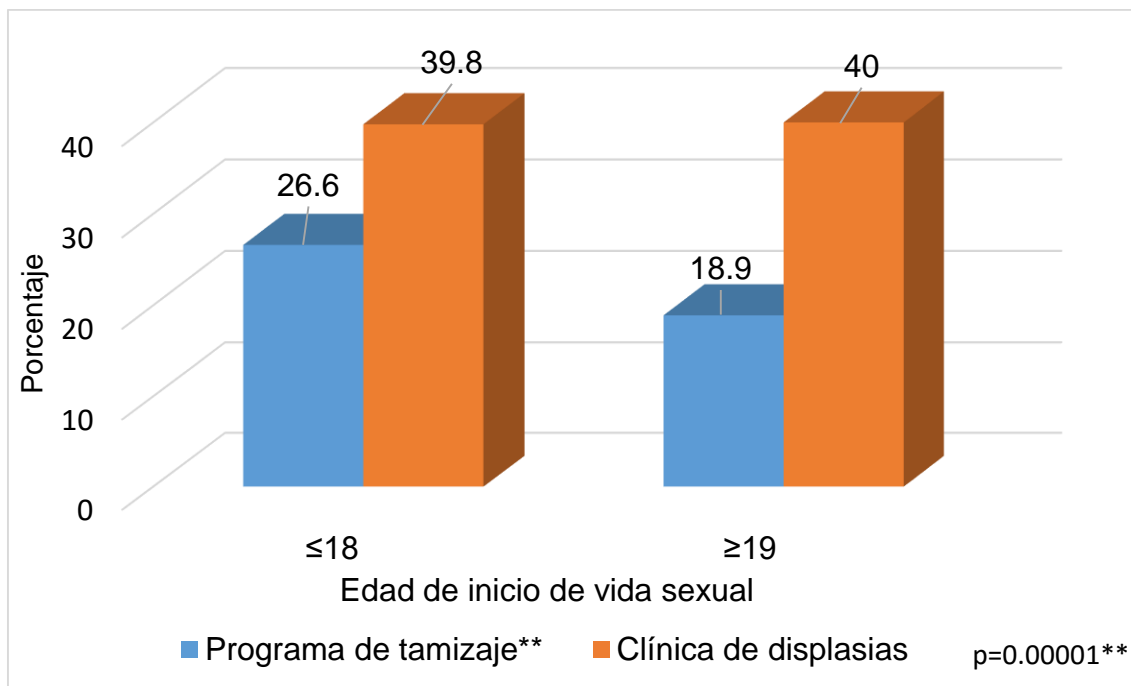


Figura 20. Prevalencia de casos positivos a VPH-AR por edad de inicio de vida sexual. En el programa de tamizaje el mayor porcentaje de casos positivos a VPH-AR se asociaron a iniciar la vida sexual antes de los 18 años. En la población de clínica de displasias no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de VPH-AR y el IVS.

En relación número de parejas sexuales, se demostró que conforme aumenta el número de parejas sexuales, también aumenta el porcentaje de muestras positivas a VPH-AR, las pacientes que indicaron haber tenido una pareja sexual (n=458) solo 14.4% fueron positivas a VPH-AR, por otra parte, de las 373 pacientes que indicaron haber tenido más de 4 parejas sexuales, 30% fueron positivas a VPH-AR.

En general las pacientes del programa de tamizaje indicaron utilizar algún método anticonceptivo (72%), siendo la salpingloclasia u oclusión tubaria bilateral (OTB) el método de anticoncepción que utilizan preferentemente (38.7%), no han tenido ningún parto natural (47.4%), además en general negaron el consumo de tabaco y de alcohol (Tabla 7), cabe mencionar que ninguna de las características antes mencionadas tuvo una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con el resultado de VPH-AR.

Presencia de VPH y su relación con características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden a clínica de displasias.

Por otra parte, en las pacientes procedentes de clínica de displasias se comprobó que hay una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el resultado de VPH-AR y las características clínicas: grupo de edad, número de parejas sexuales, número de embarazos, tabaquismo, y anticonceptivo que utiliza la paciente (Anexo 2).

El 60.3% de las pacientes menores o igual de 24 fueron positivas a VPH-AR, después conforme avanza el grupo de edad y hasta los 49 años disminuye en la presencia de VPH-AR con 28%.9. En el grupo de edad de mayor de 50 años se observó un incremento, con 36.1% de las muestras positivas.

En relación al número de parejas sexuales, 33.8% de las pacientes que indicaron que tuvieron una pareja sexual, fueron positivas a VPH-AR, después se observó que conforme aumentaba el número de parejas, también aumentaba el porcentaje de muestras positivas a VPH-AR, teniendo en el grupo de mujeres que indicaron haber tenido más de 4 parejas sexuales, 48% fueron positivas a VPH-AR (Figura 21).

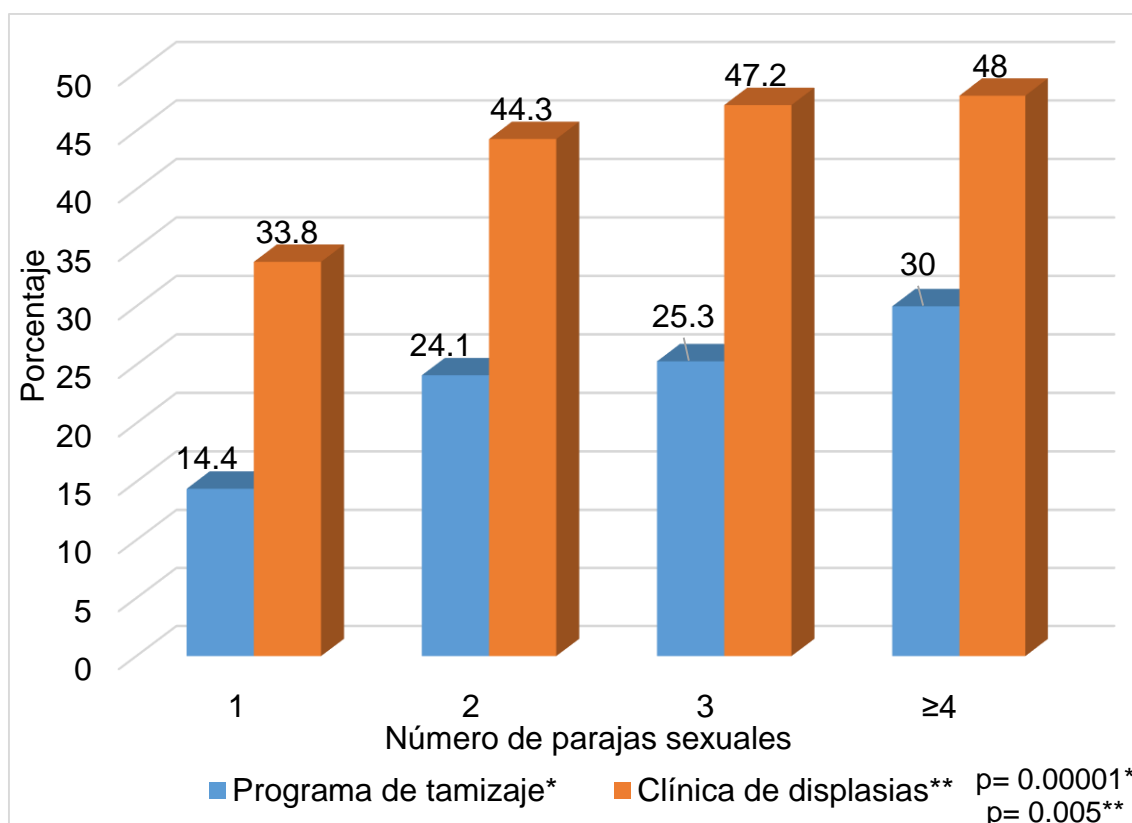


Figura 21. Prevalencia de casos positivos a VPH-AR por número de parejas sexuales. En ambas poblaciones se demostró que conforme aumentaba el número de parejas sexuales, también aumentaba el porcentaje de casos positivos VPH-AR.

88 mujeres indicaron no haber tenido ningún embarazo, de las cuales 61.4% fueron positivas a VPH-AR, después se observó una disminución del número de casos positivos a VPH-AR a mayor número de embarazos, con excepción del grupo de mujeres que indicaron haber tenido 3 embarazos a término en donde nuevamente incrementa el porcentaje de casos positivos (Figura 22).

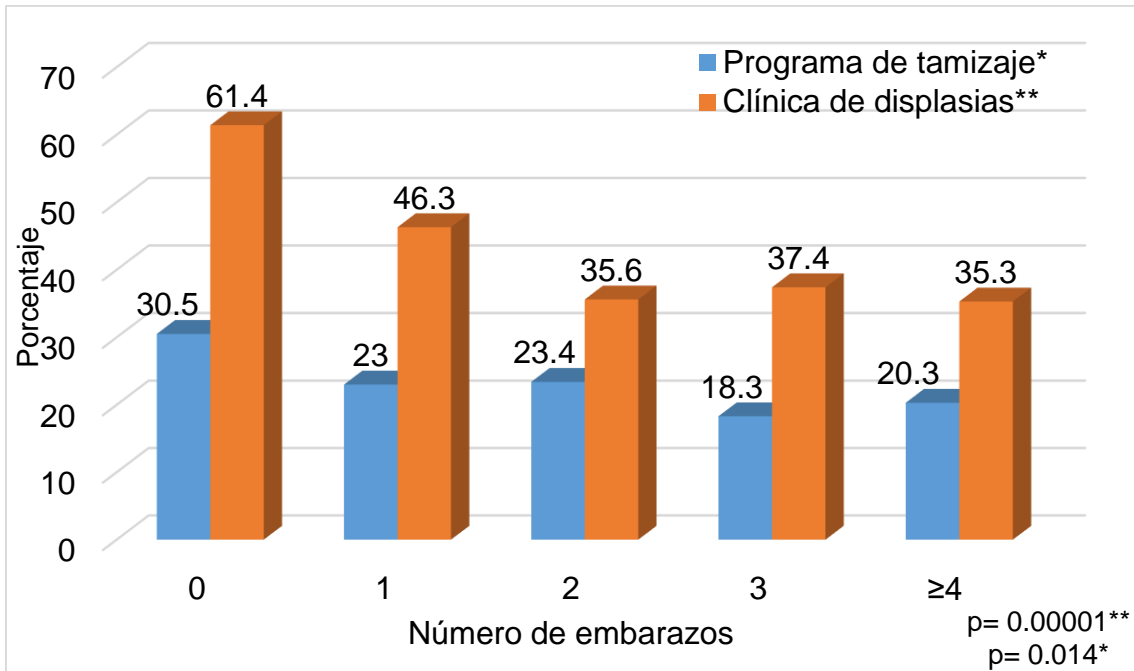


Figura 22. Prevalencia de casos positivos a VPH-AR de acuerdo con el número de embarazos. En ambas poblaciones el mayor porcentaje de casos positivos a VPH-AR se asocia a no haber tenido ningún embarazo.

Con relación al tabaquismo, 164 pacientes indicaron consumir tabaco de las cuales 45.7% fueron positivas a VPH-AR, por otra parte, de las 636 pacientes que indicaron no consumir tabaco solo 37% fueron positivas a VPH-AR (Figura 23).

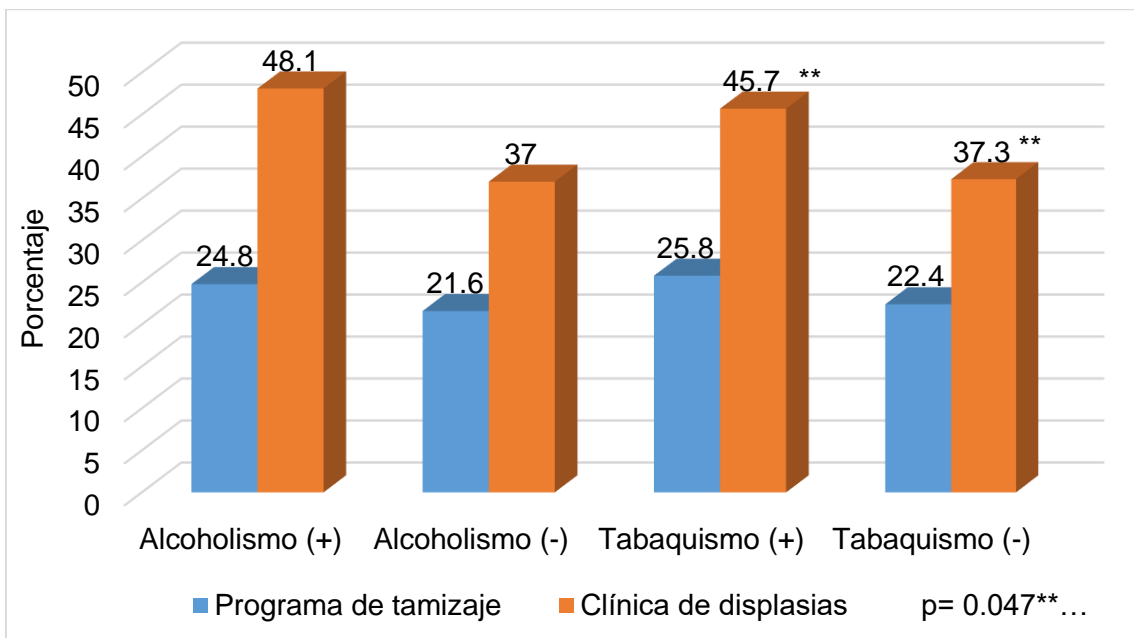


Figura 23. Porcentaje de casos positivos a VPH-AR dependiendo del consumo de tabaco o bebidas alcohólicas. En clínica de displasias, de las mujeres que consumían tabaco presentaron un mayor porcentaje de casos positivos a VPH-AR, en comparación de las que indicaron no consumirlo. En la población del programa de tamizaje no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de VPH-AR y el consumo de alcohol o tabaco.

Con relación al anticonceptivo que utilizan las pacientes, el anticonceptivo más asociado a un resultado positivo de VPH-AR fue el anticonceptivo hormonal y el condón, ya que 47% de las pacientes que refieren el uso de estos métodos fueron positivas a VPH-AR (Figura 24).

La mayoría de las pacientes que son referidas a la clínica de displasias indicaron haber iniciado su vida sexual antes de los 18 años (58.5%), no haber tenido partos naturales (32.9%), utilizar algún método anticonceptivo (71.8%), y solo el 10.6% indican que consumen bebidas alcohólicas (Tabla 7), pero en estas variables no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con relación al resultado de VPH-AR (Anexo 2).

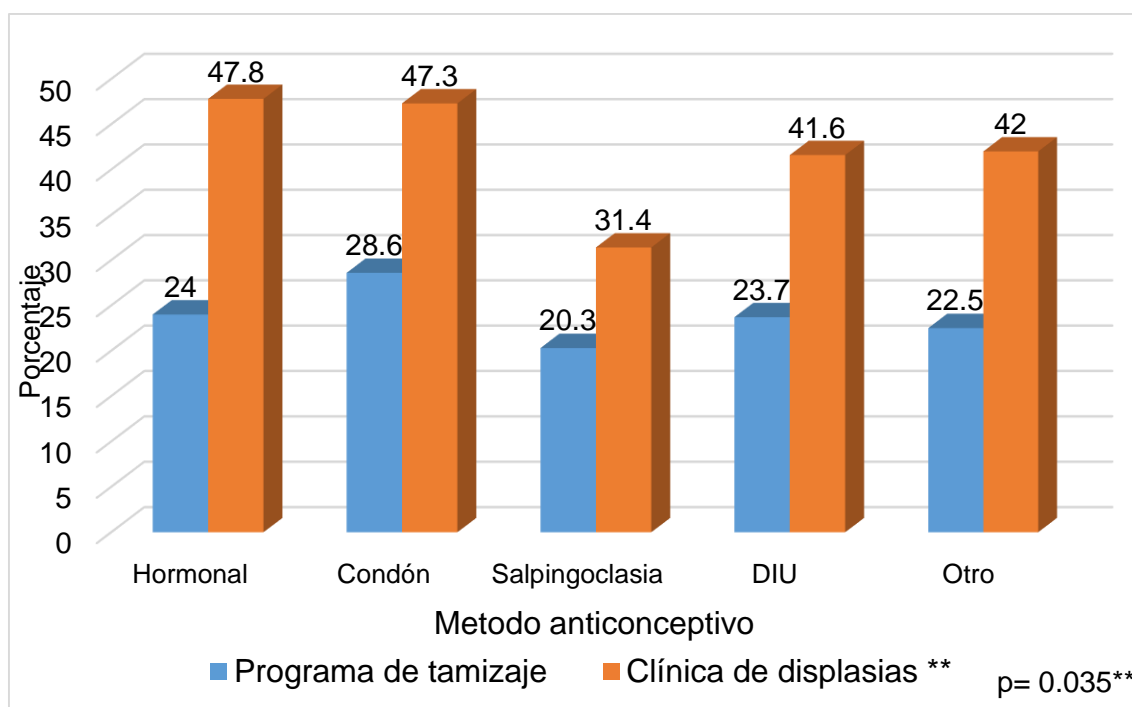


Figura 24 Porcentaje de casos positivos a VPH-AR dependiendo del método anticonceptivo que utilizan las pacientes. En la población de clínica de displasias el uso de un método anticonceptivo hormonal fue el que más se relacionó con los casos positivos a VPH-AR. En la población del programa de tamizaje no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de VPH-AR y los métodos anticonceptivos.

Del total de 2780 muestras provenientes de programa de tamizaje y de la clínica de displasias, 806 fueron positivas a VPH-AR, de las cuales, 426(52.8%) muestras fueron procedentes de la clínica de displasias, y 380 (47.2%) del programa de tamizaje. Respecto a los genotipos, del total de muestras positivas a VPH-AR, en ambos grupos (tamizaje y displasias) los VPH-AR distintos a 16 y 18 (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), fueron los más frecuentes con 69.5% y 77.6% respectivamente. VPH16 fue 1.6 veces más frecuentes en muestras de clínica de displasias que las de tamizaje (Figura 25).

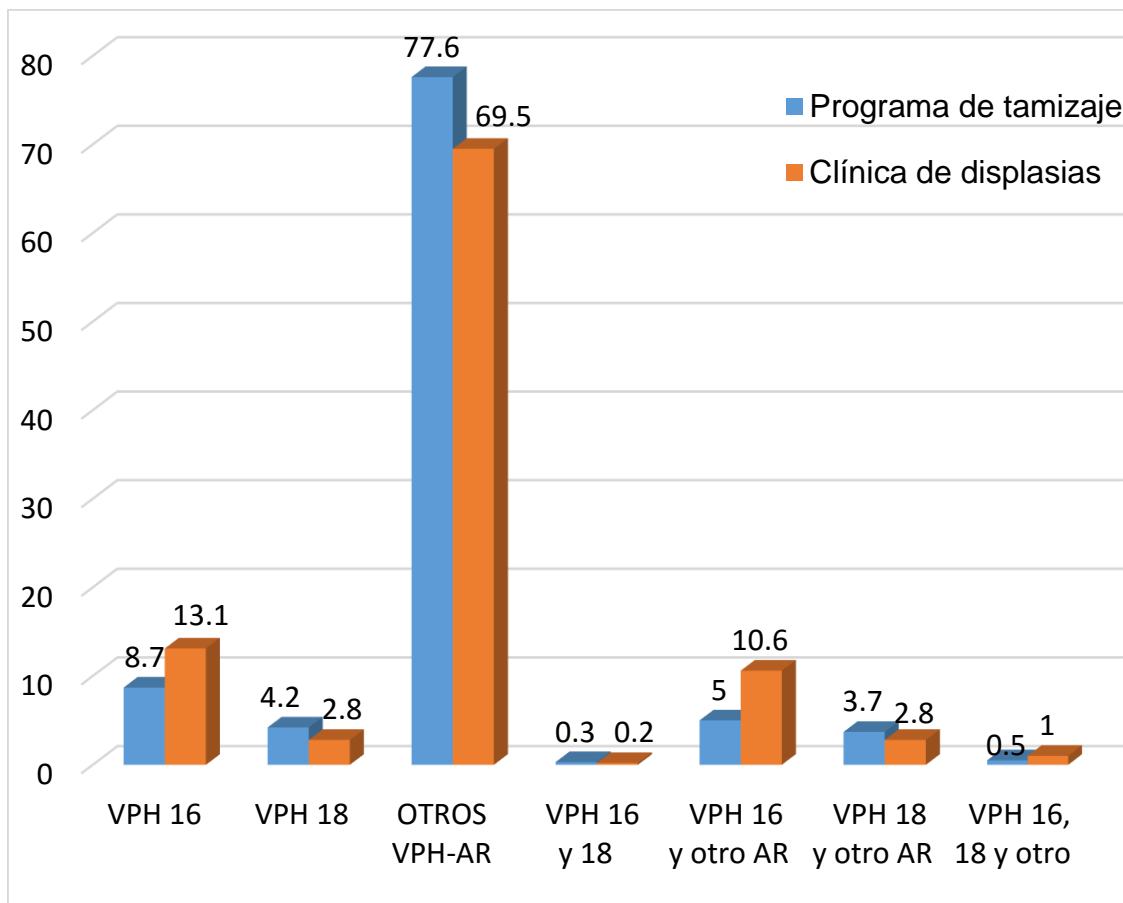


Figura 25. Prevalencia de los tipos virales de VPH-AR en el programa de tamizaje y clínica de displasias. En ambas poblaciones hay mayor predominio de los otros VPH-AR, VPH 16 es más frecuente en clínica de displasias. $p= 0.00001$

10.2 Diferencias en la prevalencia de VPH y factores de riesgo en pacientes del programa de tamizaje las poblaciones estudiadas.

De las 4 sedes participantes en el programa de tamizaje, se recolectaron 1706 muestras, de las cuales, más de la mitad son procedentes de la CDMX (58.3%), mientras que la sede con menor número de muestras fue Puebla (8.7%). El porcentaje de muestras positivas a VPH-AR varía dependiendo de la sede, siendo Quintana Roo la sede de mayor prevalencia con un 38.3% y Guerrero la de menor prevalencia con 15.3% (Figura 26).

Tabla 8. Prevalencia de VPH-AR en programa de tamizaje por sede

Sede	Muestras negativas a VPH-AR		Muestras positivas a VPH-AR		p
	n	%	n	%	
CDMX	810	81.5	184	18.5	0.00001
Puebla (Tehuacán)	125	83.3	25	16.7	
Guerrero (Taxco)	161	84.7	29	15.3	
Quintana Roo (Cancún)	230	61.7	142	38.3	
Total	1326	77.8	380	22.2	

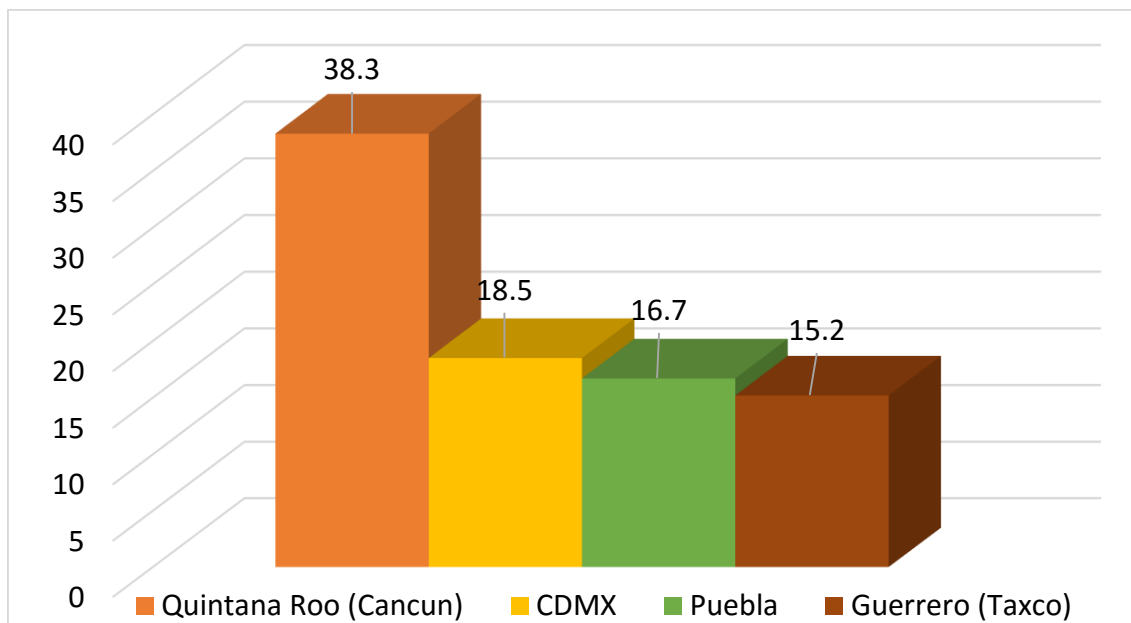


Figura 26. Prevalencia de VPH-AR positivo en el programa de tamizaje por sede. 22.3% (± 8.4) del total de las muestras fueron positivas a VPH-AR, la sede de Quintana Roo es la de mayor prevalencia con el 38.3% y Guerrero la de menor con el 15.2%

Los genotipos más frecuentes en todas las sedes fueron los perteneciente al pool de otros VPH de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) representando el 77.07% (± 3.22) de todos los casos positivos a VPH-AR, siendo Puebla donde dicho grupo fue más frecuente (80%) y Guerrero con la menor frecuencia (72.5%). El genotipo de VPH 16 fue más prevalente en la sede de Guerrero con el 20.7%, mientras que en Puebla fue menos prevalente con el 4%. VPH 18 fue más frecuente en Quintana Roo (5.6%) y menos frecuente en la CDMX (3.2%). VPH 16 en las sedes CDMX, Puebla y Guerrero fue más frecuente que VPH 18.

En relación con las infecciones múltiples, debido a que la técnica sólo pude genotipificar VPH 16 y VPH 18, se consideran las monoinfecciones como aquellos casos en los que sólo se identificó VPH16 o VPH18. Mientras que para las coinfecciones debido a que no se evaluó el grupo identificado como otros VPH-AR no se puede determinar si es uno o más genotipos de alto riesgo, por lo que solo se consideran las combinaciones VPH 16 y otro(s) VPH-AR, VPH 18 y otro(s) VPH-AR, VPH 16 y 18, VPH 16, 18 y otro(s) VPH-AR.

Tabla 9. Distribución de genotipos de VPH-AR en muestras positivas

	VPH 16		VPH 18		Otros VPH-AR		VPH 16 y O		VPH 18 y O		16 y 18		16, 18 y O		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CDMX	15	8.2	6	3.2	144	78.3	11	6	8	4.3	0	0	0	0	184	100
Puebla	1	4	1	4	20	80	1	4	2	8	0	0	0	0	25	100
Guerrero	6	20.7	1	3.4	21	72.5	0	0	0	0	0	0	1	3.4	29	100
Quintana Roo	11	7.8	8	5.6	110	77.5	7	4.9	4	2.8	1	0.7	1	0.7	142	100

O=Otros VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) $p=0.0001$

Las coinfecciones representan al menos un 10% de todas las muestras positivas a VPH-AR, en donde Puebla posee el mayor porcentaje de coinfecciones (60.0%), por otra parte, Guerrero posee el menor porcentaje (12.5%) al presentar un caso único de coinfección de los genotipos 16, 18 y otro(s) VPH-AR (tabla 10). La coinfección de VPH 16 junto con otro(s) VPH-AR, es la más frecuente representando el 52.7% de todas las coinfecciones, mientras que la combinación de VPH 16 y 18 solo un 2.7 %, al solo presentarse un caso, y fue en la sede de Quintana Roo (Tabla 9).

Tabla 10. Distribución de mono y coinfecciones por sede de pacientes que acuden al programa de tamizaje

	Monoinfecciones VPH 16 o 18		Coinfecciones*		Total		P
	n	%	n	%	n	%	
CDMX	21	52.5	19	47.5	40	100	0.00001
Puebla	2	40.0	3	60.0	5	100	
Guerrero	7	87.5	1	12.5	8	100	
Quintana Roo	19	59.4	13	40.6	32	100	

* Se consideraron las siguientes combinaciones VPH16 y otro(s), VPH 18 y otro(s), VPH 16 y 18, y VPH 16, 18 y otro(s). No se evaluó el grupo identificado sólo como otros VPH, debido a que no se puede discriminar uno o más genotipos ya que se detecta un pool de 12 genotipos.

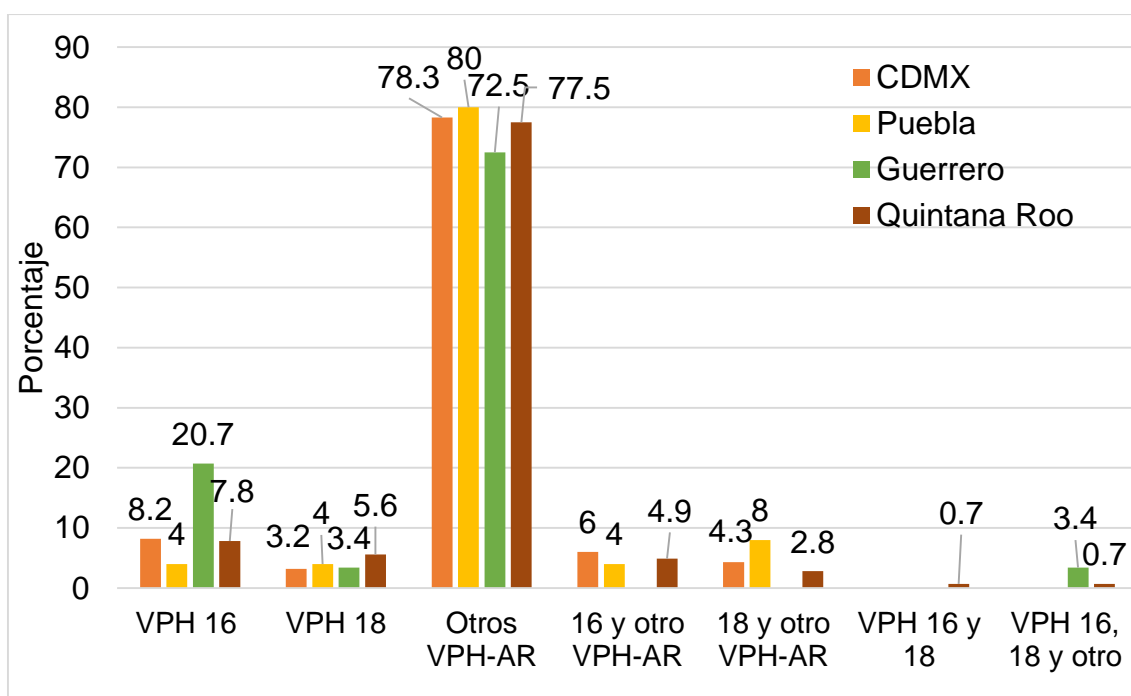


Figura 27. Distribución de los tipos virales de VPH-AR en el programa de tamizaje por sede. En todas las sedes prevalece el grupo identificado como otros VPH-AR, además VPH 16 es más frecuente que VPH 18 en la sede de CDMX, Guerrero y Quintana Roo

Características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden al programa de tamizaje por sede

En relación con la población general de cada una de las sedes del programa de tamizaje se demostró que poseen una asociación estadísticamente significativa con una $p < 0.05$, en todas las variables analizadas, (edad, edad de inicio de vida sexual, número de embarazos y partos, alcoholismo, tabaquismo, y uso de anticonceptivos) (Anexo 3)

En la sede de la CDMX las pacientes son principalmente del rango de edad de 30 a 39 años (32.8%), además indicaron principalmente haber iniciado su vida sexual después de los 19 años (53.9%), haber tenido más de 4 parejas sexuales (27.9%), 2 embarazos a término (28.7%), 0 partos naturales (54.8%), emplear algún tipo de método anticonceptivos (73.6%), primordialmente la oclusión tubaria bilateral (OTB) como el método de anticoncepción de preferencia (30.5%), por último, negaron el consumo de tabaco y de alcohol.

La sede de Guerrero tuvo pacientes principalmente del rango de edad de 40-49 años (36%), señalaron haber iniciado su vida sexual después de los 19 años (57.5%), haber tenido una pareja sexual (57.9%), 2 embarazos a término (31%), 0 partos (36.9%), usar algún método anticonceptivo (76.6%), usar como método anticonceptivo la OTB (50%), y solo el 8.1% y 10.6% indicaron consumir tabaco y bebidas alcohólicas respectivamente.

Por último, en las sedes de Quintana Roo y sede de Puebla, las pacientes fueron en general del rango de 30-39 años (33.1% y 30% respectivamente), mencionaron que iniciaron su vida sexual antes de los 18 años (62.9% y 55%), que solo han tenido una pareja sexual (27.8% y 32%), 2 embarazos a término (29.1% y 27.3%), 0 partos naturales (33.9% y 47.3%), usar algún método anticonceptivos (64.6% y 74.7%), usar como método anticonceptivo la OTB (53.7% y 42.5%), y un bajo consumo de tabaco (20.1% y 27.5%), y bebidas alcohólicas (23.8% y 15.8%).

Presencia de VPH y su relación con características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden al programa de tamizaje

Se evaluaron las características clínicas de las pacientes VPH-AR positivas, en relación con las sedes, para identificar cuáles son las características clínicas distintivas entre las sedes ($p < 0.05$) (anexo 4).

Respecto a la edad, se observaron diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas respecto a la sede, excepto en las menores de 24 y en mayores de 50. Es decir, la positividad a VPH-AR es independiente de la sede en mujeres menores de 24 y mayores de 50 años, no así en los otros rangos de edad. Quintana Roo es la sede dónde se identifica mayor proporción de mujeres VPH-AR positivas.

Con relación al número de parejas sexuales, se comprobó que hay diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas con respecto a la sede, con la excepción del grupo de mujeres que indicaron haber tenido 4 parejas sexuales o más, por lo que, la positividad a VPH-AR es independiente de la sede en mujeres con 4 o más parejas sexuales.

En cuestión al número de partos, se observó que hay diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas con respecto a la sede, con excepción del grupo de mujeres que mencionaron haber tenido 4 o más partos, por lo tanto, la positividad a VPH-AR es independiente de la sede con mujeres que han tenido 4 partos o más.

Respecto a la edad de inicio de vida sexual, al número de embarazos, al consumo de bebidas alcohólicas, al hábito de fumar, y al uso de anticonceptivos se demostró que existen diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas respecto a la sede.

Características clínicas de las pacientes VPH-AR positivas por sede del programa de tamizaje

Con la prueba de *chi* cuadrada se evaluaron las características clínicas de las pacientes de cada una de las sedes dependiendo del resultado de la prueba de VPH-AR (anexo 4), para demostrar que características clínicas se asocian estadísticamente ($p < 0.05$) al VPH-AR.

El grupo de edad de 24 años o menos de las sedes de CDMX, y Guerrero tuvieron 13 y 7 mujeres respectivamente, teniendo 9(69.2%) y 5(71.4%) casos positivos a VPH-AR, sin embargo, en la sede de Guerrero disminuye el porcentaje de casos positivos a VPH-AR conforme aumenta el grupo de edad, con excepción del grupo de mayores de 50 años en donde se vuelve a incrementar el porcentaje de casos positivos, por otra parte, en la sede de la CDMX el grupo de 25 a 29 tuvo el mayor porcentaje de casos ya que de las 37 muestras, 27 (73.0%) fueron positivas, en los siguientes dos grupos de edad disminuyó el porcentaje de casos positivos y nuevamente en el grupo de mayores de 50 años aumento al tener 37(42.0%) muestras positivas de un total de 88 muestras. En las sedes de Quintana Roo y Puebla no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de VPH-AR y el grupo de edad.

En relación con la edad de inicio de vida sexual en la sede de la CDMX, 416 pacientes indicaron haber comenzado su vida sexual a los 18 años o antes, de las cuales, 23.8% fueron positivas a VPH-AR, en contraste, 486 mujeres indicaron haber comenzado su vida sexual después de los 19 años, solo 15.8% fueron positivas a VPH-AR. En las sedes de Guerrero, Quintana Roo y Puebla no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de VPH-AR y el IVS.

Respecto al número de parejas sexuales, se demostró que hay diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas respecto a la sede, excepto en las que han tenido 4 o más parejas sexuales. En las sedes de CDMX, que conforme aumenta el número de parejas, también aumenta el porcentaje de muestras positivas a VPH-AR, ya que de las 218 pacientes procedentes de la CDMX que indicaron haber tenido una pareja sexual solo 10.1% fueron positivas a VPH-AR, por otra parte, de las 249 pacientes que indicaron haber tenido más de 4 parejas sexuales, 27.3% fueron positivas a VPH-AR. En la sede de Guerrero el grupo de mujeres que han tenido una pareja sexual está conformado por 95 mujeres de las cuales 9.5% fueron positivas a VPH-AR. Por otra parte, se observó que el porcentaje máximo de casos positivos a VPH-AR, fue en el grupo con 3 parejas sexuales, con 42.9%. En las sedes de Quintana Roo y Puebla no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de VPH-AR y el número de parejas sexuales.

Por último, en la sede de Puebla, 17 pacientes indicaron no haber tenido ningún embarazo, de dicho grupo 47.1% fueron positivas a VPH-AR. Se observó que en los grupos de 1 y 3 embarazos a término tuvieron el menor porcentaje de casos positivos a VPH-AR, teniendo 6.7% cada uno. En el resto de las sedes no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de VPH-AR y el número de embarazo.

El resto de las características clínicas analizadas no poseen una asociación significativa con relación al resultado del VPH-AR y la sede.

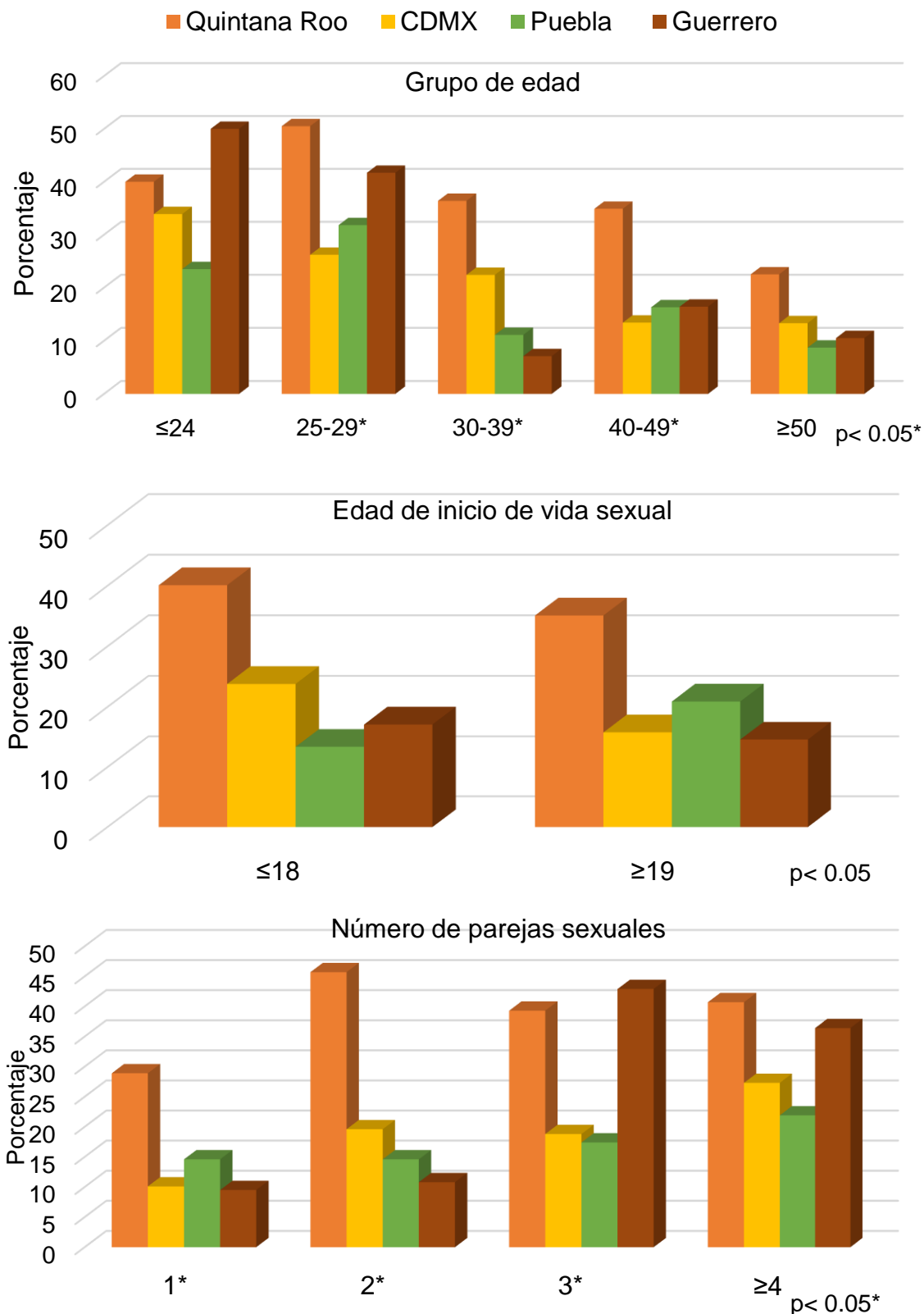


Figura 28. Comparativo de la prevalencia de casos positivos de VPH-AR por sede dependiendo de las características clínicas. En el grupo de edad, se observaron diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas respecto a la sede, excepto en las menores de 24 y en mayores de 50. El número de parejas sexuales, hay diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas con respecto a la sede, con la excepción del grupo que indico haber tenido 4 o más parejas sexuales

10.3 Diferencias en la prevalencia de VPH y factores de riesgo en pacientes procedentes de clínica de displasias en las poblaciones estudiadas.

Se recolectaron 1074 muestras de clínicas de displasias, en la CDMX se recolectó el mayor número de muestras (31.9%) y Puebla fue la de menor número con el 9.3%. Los resultados muestran que la prevalencia de VPH-AR varían dependiendo de la sede, siendo en la CDMX más prevalente con un 48.7% y Puebla la menor con el 20%. Del total 426 muestras fueron positivas a VPH-AR, lo que representa 39.6% (± 11.13) de los casos.

Tabla 11. Prevalencia de VPH-AR en clínica de displasias por sede

Sede	Muestras negativas a VPH-AR por sede		Muestras positivas a VPH-AR por sede		p
	n	%	n	%	
CDMX	176	51.3	167	48.7	0.00001
Puebla (Tehuacán)	80	80.0	20	20.0	
Guerrero (Taxco)	141	68.2	66	31.8	
Yucatán	129	56.3	100	43.7	
Quintana Roo (Cancún)	122	62.6	73	37.4	
Total	649	60.4	426	39.6	

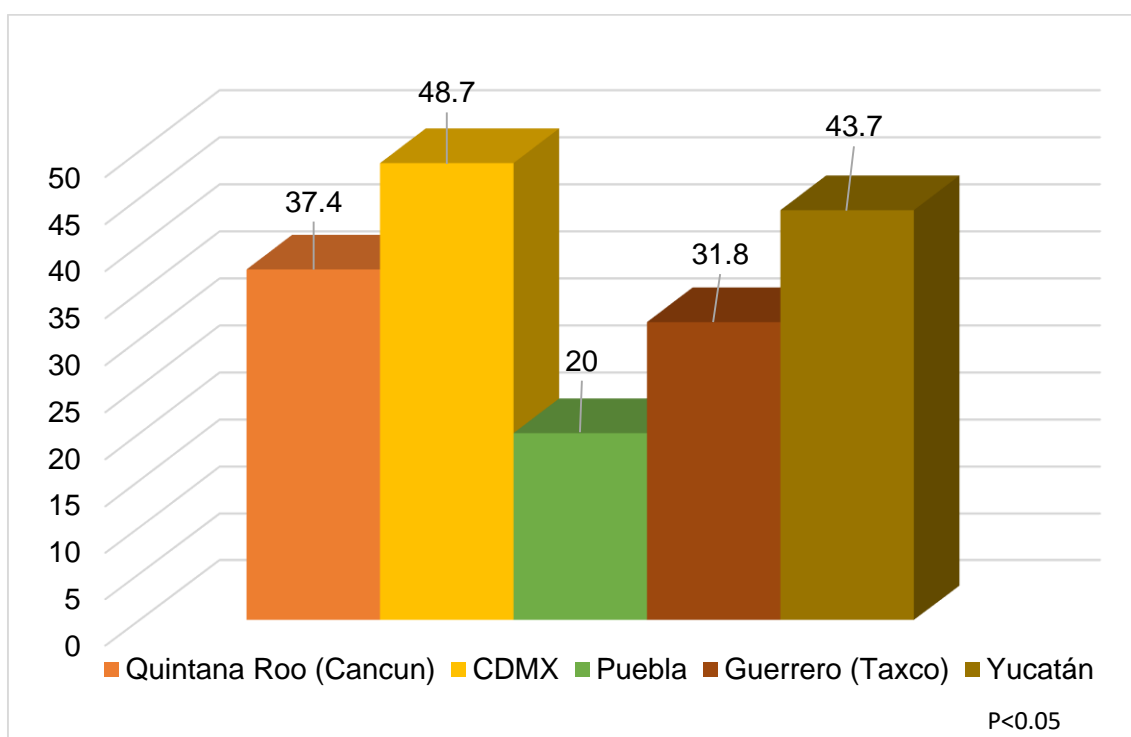


Figura 29. Prevalencia de VPH-AR positivo en clínicas de displasias por sede. En promedio el 40% de las muestras fueron positivas a VPH-AR, en donde la CDMX es la sede con mayor prevalencia con el 48.7% y Puebla con la de menor con el 20%

Considerando todas las muestras positivas las infecciones por otros VPH-AR diferentes a 16 y 18, son las más frecuentes representando el 69.3% (n=296). En todas las sedes las infecciones exclusivas por VPH 16, son más frecuentes que las de VPH 18. El genotipo 16 fue más frecuente en Puebla representado el 15% del total, mientras que en Guerrero fue menos frecuente con el 9.1%, por su parte el genotipo 18 fue más frecuente en Puebla con el 10%, y la CDMX fue la sede con menos frecuencia con el 1.2%.

Tabla 12. Distribución de genotipos de VPH-AR en muestras positivas

	VPH 16		VPH 18		Otros VPH-AR		VPH 16 y O		VPH 18 y O		16 y 18		16, 18 y O		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CDMX	24	14.4	2	1.2	113	67.7	17	10.1	6	3.6	1	0.6	4	2.4	167	100
Puebla	3	15	2	10	14	70	1	5	0	0	0	0	0	0	20	100
Guerrero	6	9.1	2	3	49	74.2	7	10.6	2	3.1	0	0	0	0	66	100
Yucatán	14	14	5	5	69	69	11	11	1	1	0	0	0	0	100	100
Quintana Roo	9	12.3	1	1.4	51	69.9	9	12.3	3	4.1	0	0	0	0	73	100

O=Otros VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).

Las infecciones múltiples, representan al menos el 14.3% del total de las 426 muestras positivas. La coinfección más frecuente es la del genotipo 16 junto con otro genotipo de alto riesgo, mientras que la de VPH 16 y 18 es la menos frecuente al estar exclusivamente en la CDMX. Las mono infecciones fueron más prevalentes en Puebla (83.3%) mientras que las coinfecciones en Quintana Roo (54.5%)

Tabla 13. Distribución de infecciones únicas y múltiples por sede, en clínicas de displasias

	Mono infecciones VPH 16 o 18		Coinfecciones*		Total		p
	n	%	n	%	n	%	
CDMX	26	48.1	28	51.9	54	100	0.002
Puebla	5	83.3	1	16.7	6	100	
Guerrero	8	47.1	9	52.9	17	100	
Yucatán	19	61.3	12	38.7	31	100	
Quintana Roo	10	45.5	12	54.5	22	100	

* Se consideraron las siguientes combinaciones VPH16 y otro(s) VPH-AR, VPH 18 y otro(s) VPH-AR, VPH 16 y 18, VPH 16, 18 y otro(s) VPH-AR. No se evaluó el grupo identificado sólo como otros VPH-AR, debido a que no se puede discriminar uno o más genotipos ya que se detecta un pool de 12.

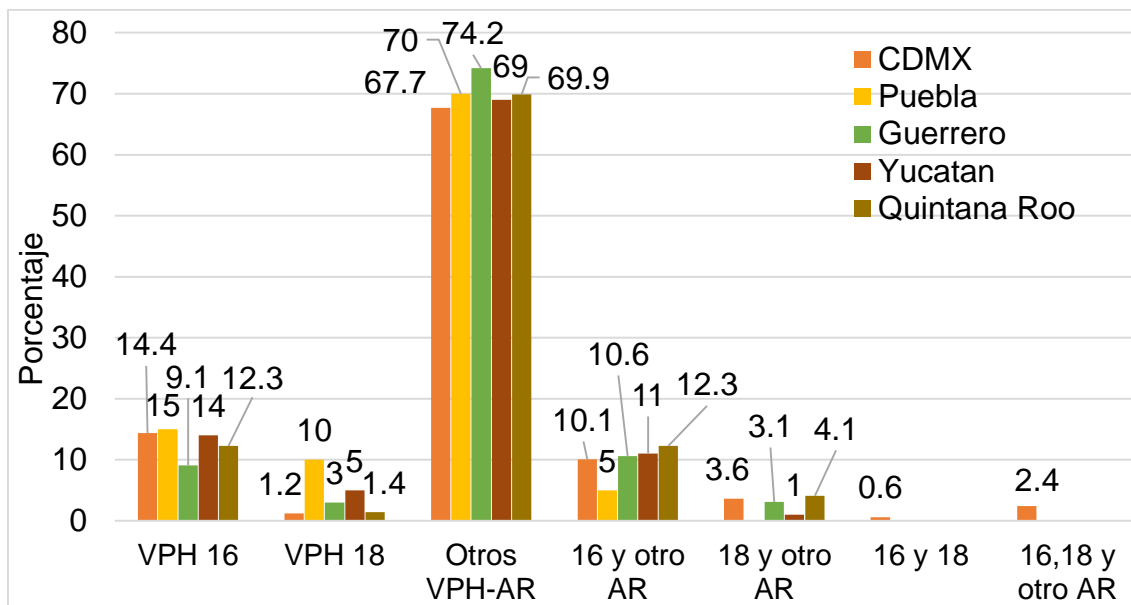


Figura 30. Distribución de los tipos virales de VPH-AR en clínica de displasias por sede. En todas las sedes prevalece el grupo identificado como otros VPH-AR, además VPH 16 es más frecuente que VPH 18

Características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden a clínica de displasias por sede

Se evaluaron las características clínicas de las pacientes VPH-AR positivas, en relación con las sedes, para identificar cuáles son las características clínicas distintivas entre las sedes ($p < 0.05$) (anexo 6).

Respecto a la edad, se observaron diferencias significativas exclusivamente en las pacientes VPH-AR positivas de 25 a 29 años respecto a la sede.

Con relación al número de parejas sexuales, se comprobó que hay diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas con respecto a la sede, con la excepción del grupo de mujeres que indicaron haber tenido 3 y 4 o más parejas sexuales.

En cuestión al número de embarazos, se observó que en el grupo de pacientes VPH-AR positivas que mencionaron haber tenido 3 y 4 ó más embarazos hay diferencias con respecto a la sede, por lo tanto, la positividad a VPH-AR es independiente de la sede con mujeres que han tenido 0 y 1 embarazo.

Con relación a la edad de IVS, se observaron diferencias significativas exclusivamente en las pacientes VPH-AR positivas que inician su vida sexual después de los 19 años con respecto a la sede. Es decir, la positividad a VPH-AR es independiente de la sede en mujeres que inician su vida sexual antes de los 18 años

Por último, con respecto al número de partos, al consumo de bebidas alcohólicas, al hábito de fumar, y al uso de anticonceptivos se demostró que no existen diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas respecto a la sede

Presencia de VPH y su relación con características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden a clínica de displasias.

Se evaluaron las características clínicas de las pacientes VPH-AR positivas, en relación con las sedes, para identificar cuáles son las características clínicas distintivas entre las sedes ($p < 0.05$) (anexo 6).

Respecto a la edad, se observaron diferencias significativas exclusivamente en las pacientes VPH-AR positivas de 25 a 29 años respecto a la sede.

Con relación al número de parejas sexuales, se comprobó que hay diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas con respecto a la sede, con la excepción del grupo de mujeres que indicaron haber tenido 3 y 4 o más parejas sexuales.

En cuestión al número de embarazos, se observó que en el grupo de pacientes VPH-AR positivas que mencionaron haber tenido 3 y 4 ó más embarazos hay diferencias con respecto a la sede, por lo tanto, la positividad a VPH-AR es independiente de la sede con mujeres que han tenido 0 y 1 embarazo.

Con relación a la edad de IVS, se observaron diferencias significativas exclusivamente en las pacientes VPH-AR positivas que inician su vida sexual después de los 19 años con respecto a la sede. Es decir, la positividad a VPH-AR es independiente de la sede en mujeres que inician su vida sexual antes de los 18 años

Por último, con respecto al número de partos, al consumo de bebidas alcohólicas, al hábito de fumar, y al uso de anticonceptivos se demostró que no existen diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas respecto a la sede

Características de las pacientes VPH-AR positivas en cada una de las sedes de la clínica de displasias.

Con la prueba de *chi* cuadrada se evaluaron las características clínicas de las pacientes de cada una de las sedes dependiendo del resultado de la prueba de VPH-AR (anexo 6), para demostrar que características clínicas se asocian estadísticamente ($p < 0.05$) al VPH-AR.

Se demostró que el VPH-AR en la sede CDMX se asocia al grupo de edad, en la sede de Guerrero al grupo de edad, y al número de embarazos, en la sede de Puebla al número de parejas sexuales y, por último, en las sedes de la península de Yucatán (Quintana Roo y Yucatán), no hubo ninguna asociación entre alguna característica clínica y el resultado de VPH-AR.

El grupo de edad de 24 años o menos de las sedes de CDMX y Guerrero fueron 69.2% y 71.4% positivas a VPH- AR respectivamente. Sin embargo, en la sede de Guerrero disminuye el porcentaje de casos positivos a VPH-AR conforme aumenta el grupo de edad, con excepción del grupo de mayores de 50 años en donde se vuelve a incrementar el porcentaje de casos positivos, por otra parte, en la sede de la CDMX el grupo de 25 a 29 tuvo el mayor porcentaje de casos ya que de las 37 muestras, 27 (73.0%) fueron positivas, en los siguientes dos grupos de edad disminuyó el porcentaje de casos positivos y nuevamente en el grupo de mayores de 50 años aumento al tener 37(42.0%) muestras positivas de un total de 88 muestras.

En relación número de parejas sexuales en la sede de Puebla, se demostró que conforme aumenta el número de parejas sexuales, también aumenta el porcentaje de muestras positivas a VPH-AR, de las 34 pacientes que indicaron haber tenido una pareja sexual solo 3(8.8%) fueron positivas a VPH-AR, por otra parte, de las 4 pacientes que indicaron haber tenido más de 4 parejas sexuales todas fueron positivas a VPH-AR. En resto de las sedes no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de VPH-AR y el número de parejas sexuales.

16 mujeres de la sede de Guerrero indicaron no haber tenido ningún embarazo, de las cuales 62.5% fueron positivas a VPH-AR, después se observa una disminución del porcentaje de casos positivos a VPH-AR a mayor número de embarazos, en donde de las 55 mujeres que indicaron haber tenidos más de 4 embarazos a término, solo 23.6% fueron positivas a VPH-AR. En el resto de las sedes no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de VPH-AR y con el número de embarazos.

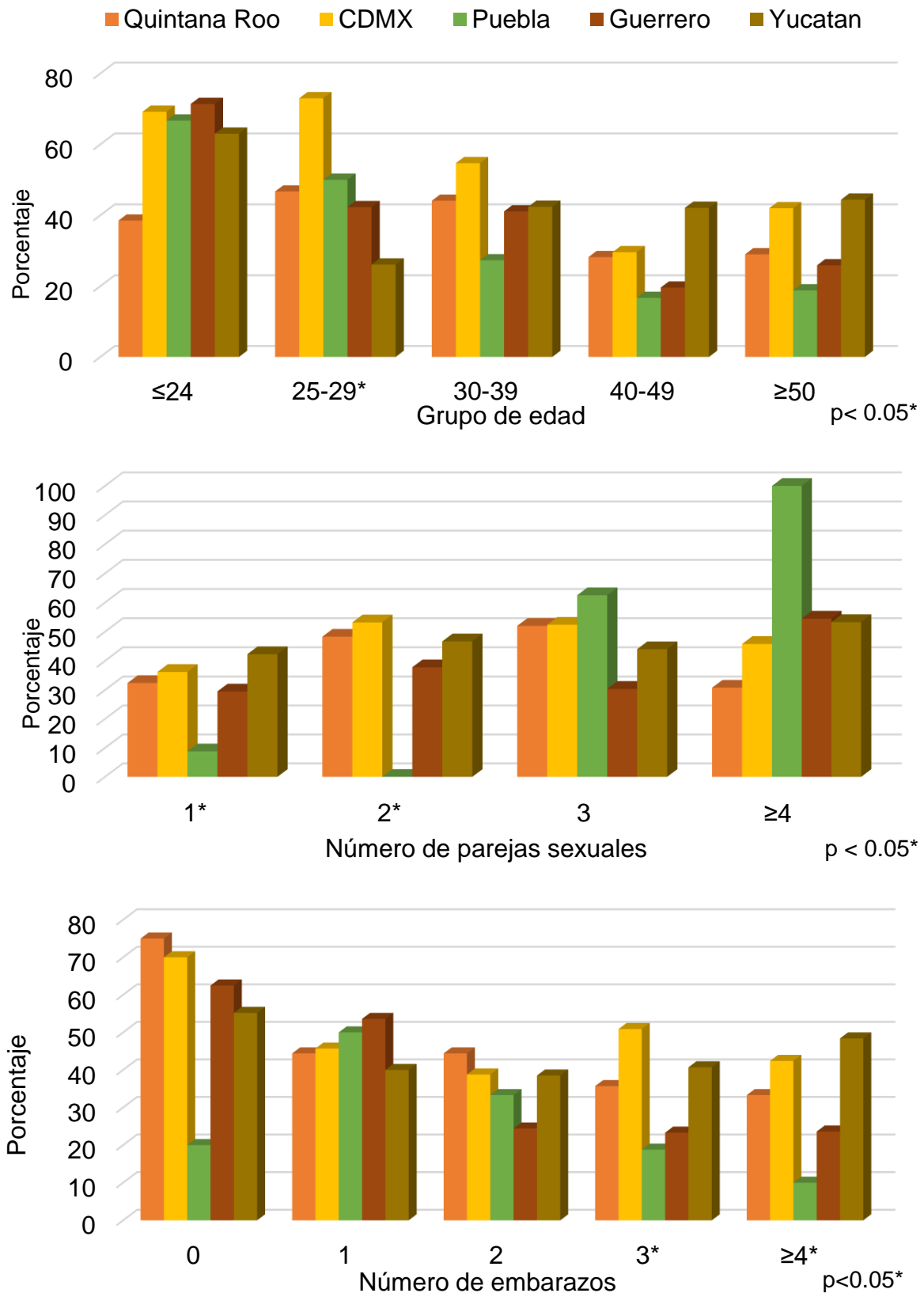


Figura 31. Comparativo de la prevalencia de casos positivos de VPH-AR por sede dependiendo de las características clínicas. Con respecto al grupo de edad, hay diferencias significativas en las pacientes VPH-AR positivas de 25 a 29 años respecto a la sede. Existen diferencias significativas en el grupo de pacientes VPH-AR positivas que hay tenido 1 o 2 parejas sexuales, y 0, 1 o 2 embarazos con respecto a la sede.

10.4 Cambios de expresión en HOXC11 y EZH2 en muestras cervicovaginales.

10.4.1 Expresión a nivel de proteína

Se realizó Inmunocitoquímica de líneas celulares de cáncer de cérvix SiHa y Caski, para poder emplearlas como control positivo en las muestras problema (Figura 32).

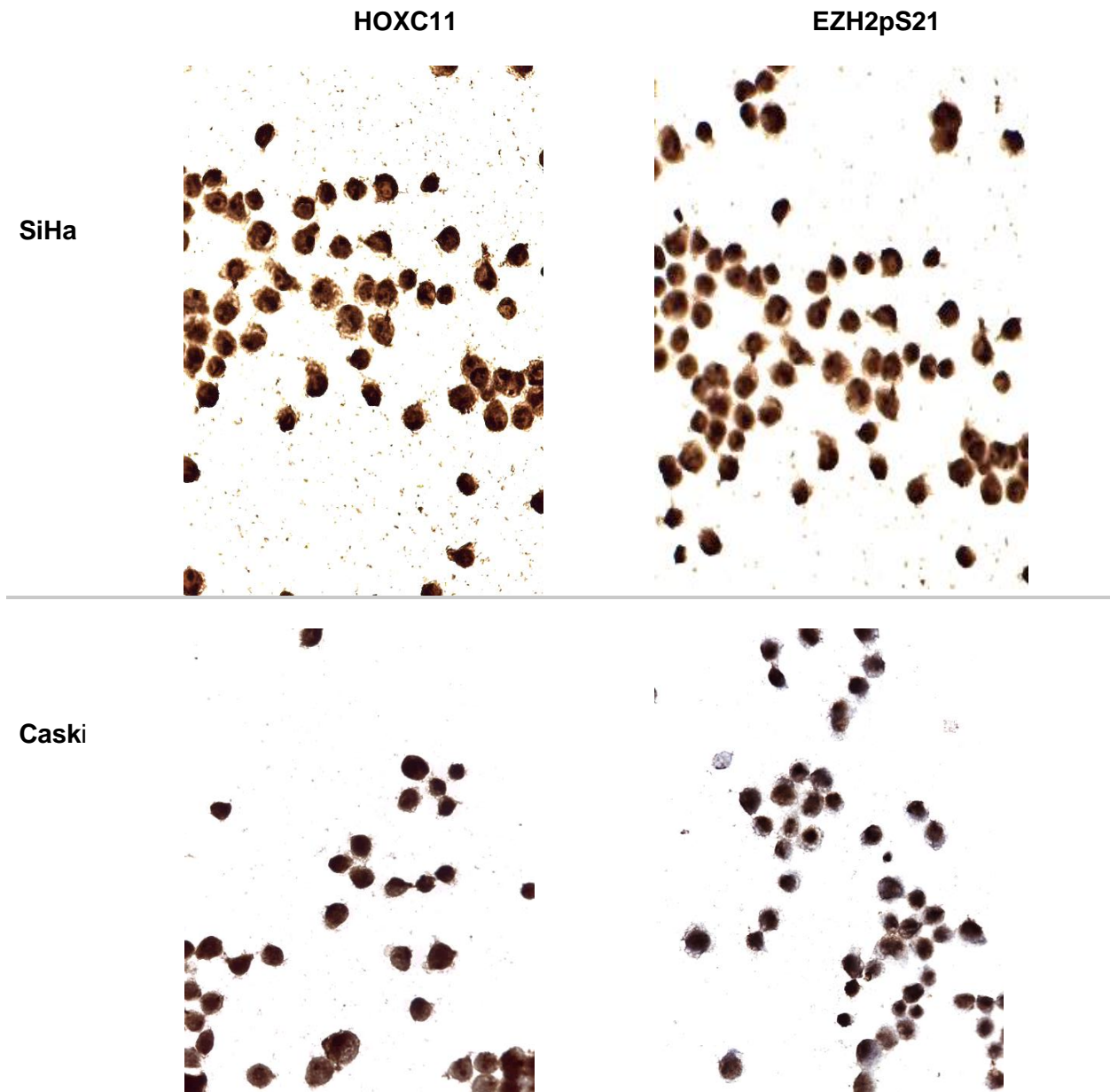


Figura 32. Inmunocitoquímica de SiHa y Caski. Se observa que en ambas líneas celulares hay una intensa positividad nuclear con ambos anticuerpos. Todas las imágenes se observan a 400x.

Se realizó la selección de muestras cervicovaginales dependiendo del resultado de la prueba de VPH-AR y de la inmunotinción p16/Ki67. Se obtuvieron 3 grupos, negativo a VPH-AR (control), positivo a VPH-AR pero negativo a p16/Ki67, y positivo a VPH-AR y p16/Ki67.

HOXC11 y EZH2pS21 son proteínas que se localizan principalmente en el núcleo celular, por lo que para emitir un resultado positivo se debe observar el núcleo de color café. El resultado se reportó de dos maneras; negativo/positivo con intensidad baja y positivo con intensidad moderada/alta (Figura 33).

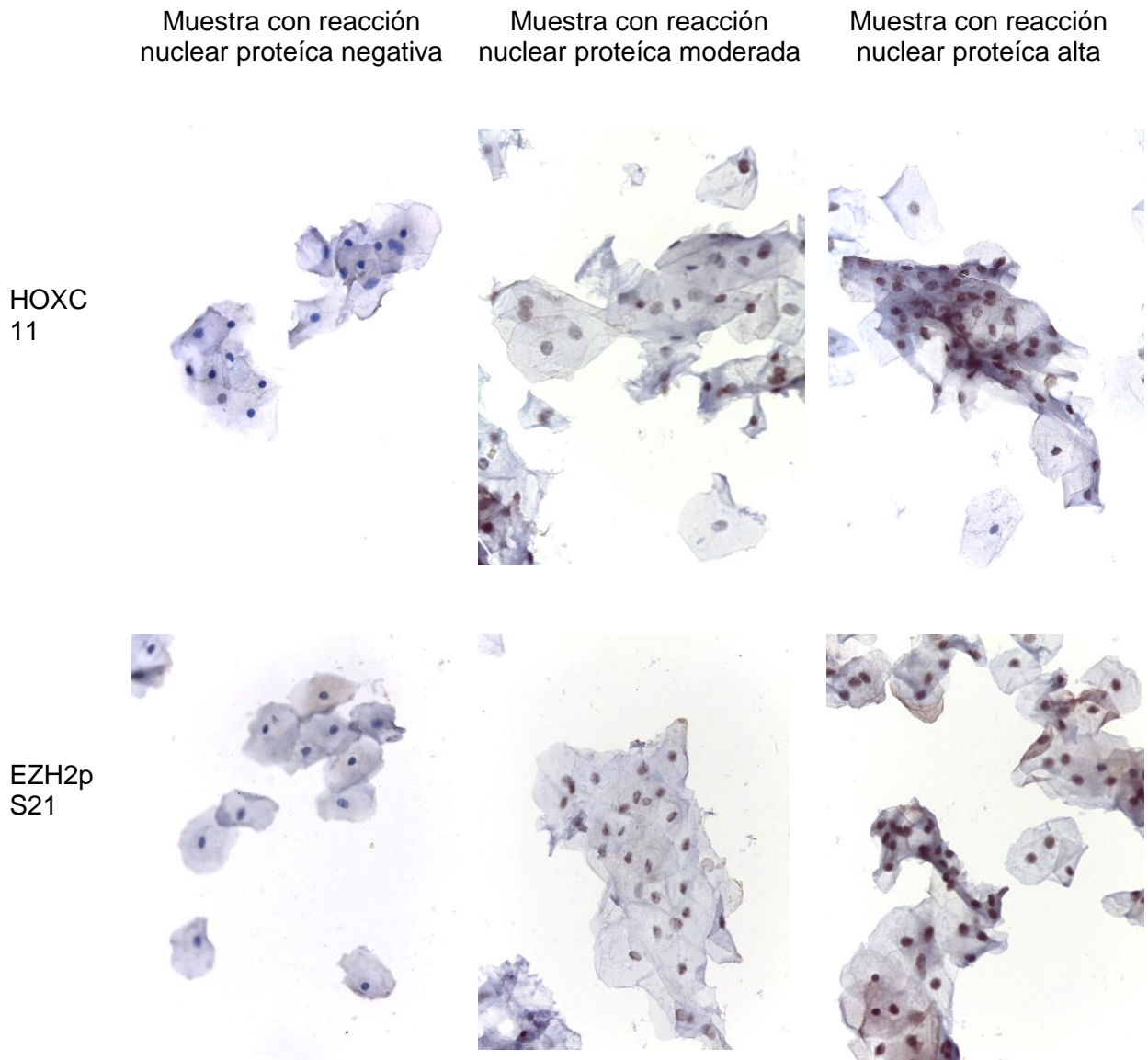


Figura 33. Expresión proteica de HOXC11 y EZH2pS21 en muestras cervicovaginales. Expresión nuclear negativa, moderada y alta de las proteínas HOXC11 y EZH2pS21. Todas las imágenes se observan a un aumento de 400x.

Tabla 14. Porcentaje y frecuencia de las muestras a partir de la intensidad de las proteínas analizadas

Proteína	Intensidad	VPH-AR negativo	VPH-AR positivo; p16/Ki67 negativo	VPH-AR y p16/Ki67 positivo
HOXC11	Negativo/ Positivo bajo	83.3% (10/12)	40% (6/15)	0% (0/0)
	Moderado/ Alto	16.7% (2/10)	60% (9/15)	100% (15/15)
EZH2pS21	Negativo/ Positivo bajo	100% (12/12)	33.3% (5/15)	0% (0/0)
	Moderado/ Alto	0% (0/0)	66.7% (10/15)	100% (15/15)

Tal como se observa en la tabla 14, se identificó una tendencia de incremento en la expresión proteica de ambas proteínas (*HOXC11* y *EZH2pS21*) en las muestras positivas a VPH-AR en comparación con las negativas a VPH-AR ($p < 0.05$), por lo cual se decidió realizar un análisis cuantitativo de la expresión de estas proteínas, y de esta manera no fuese exclusivamente cualitativo. Se analizaron las fotografías de cada una de las muestras utilizando el software Image J®, el cual indica el porcentaje de expresión proteica nuclear (Figura 34).

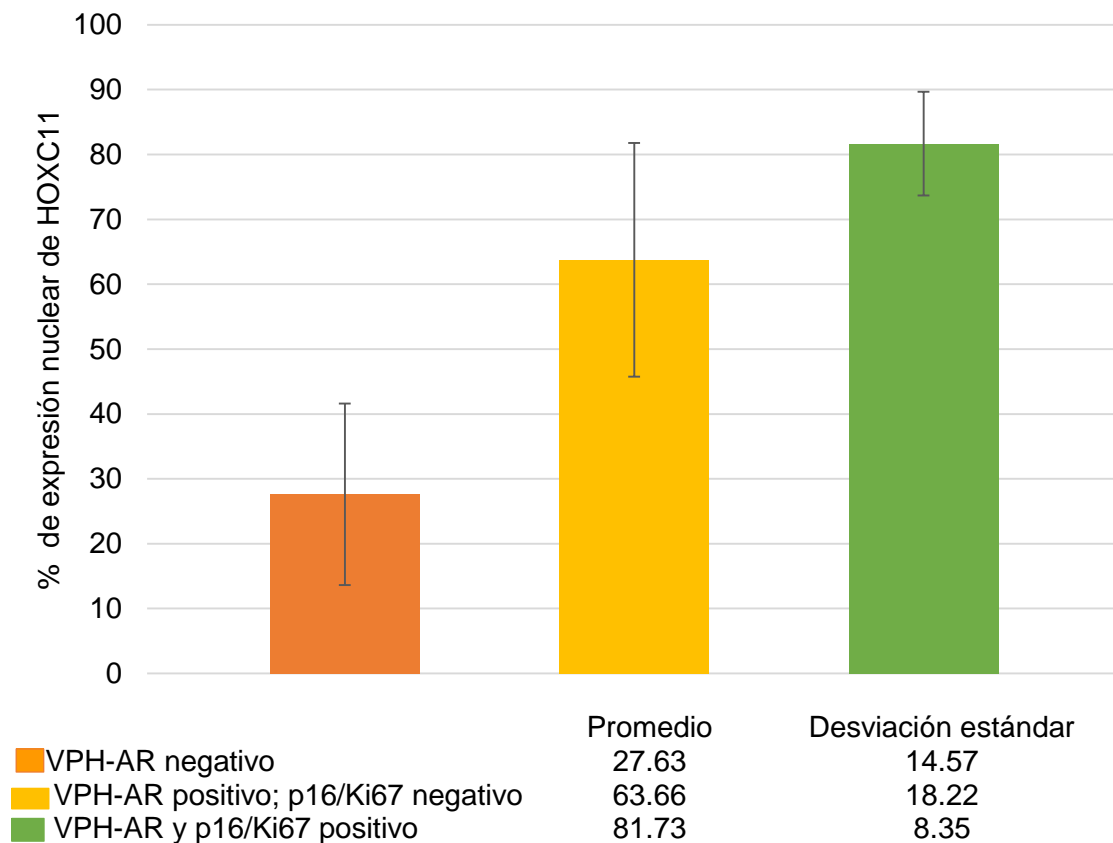


Figura 35. Comparación de la expresión proteica nuclear de HOXC11. Se observan los porcentajes promedio de expresión nuclear de cada uno de los grupos (ANOVA $p = 0.00001$)

Se realizó la prueba de ANOVA para determinar si hay diferencias entre los promedios de los 3 grupos, en donde el resultado de dicha prueba indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el promedio de expresión nuclear de HOXC11 y los grupos de las muestras estudiadas, pero para saber si hay diferencias estadísticamente significativas al comparar los 3 grupos analizados

Se realizó la prueba de Tukey, la cual indico que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los 3 grupos, por lo que se puede decir que el porcentaje de expresión nuclear de HOXC11 aumenta con la presencia del VPH-AR y a su vez hay una correlación directa entre los niveles de proteína de HOXC11 y la etapa de la infección de VPH-AR.

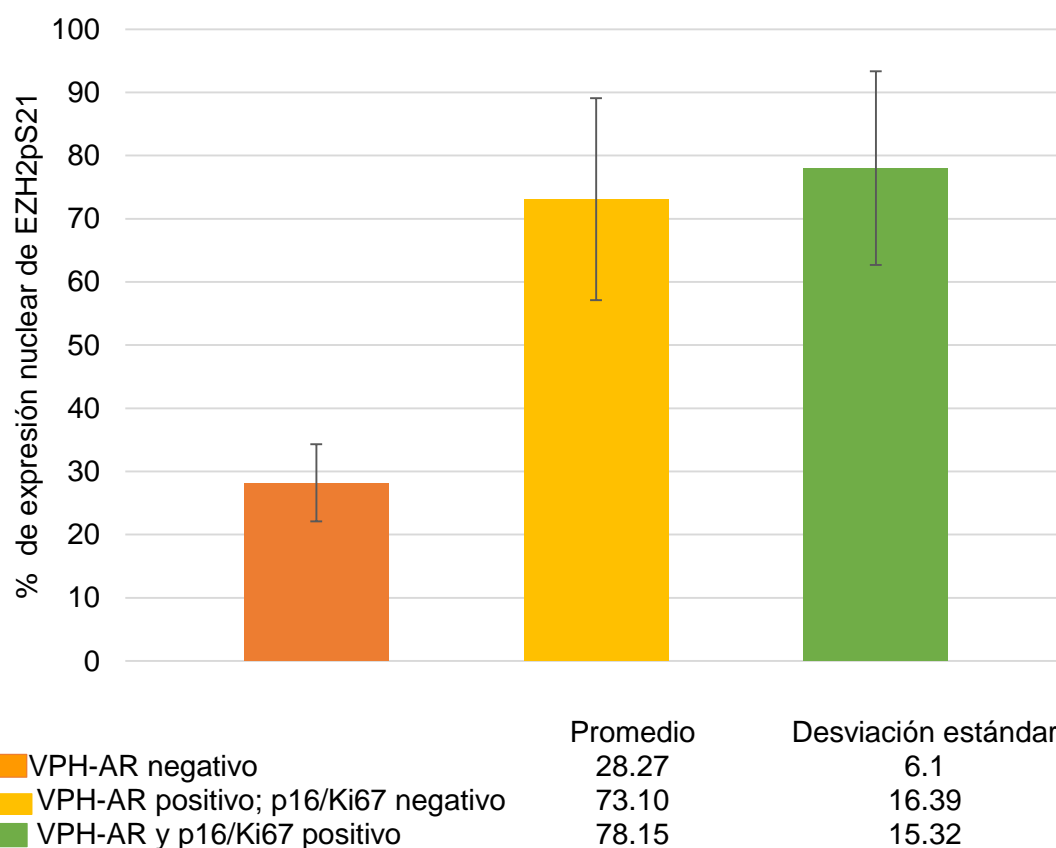


Figura 36. Comparación de la expresión proteica nuclear de EZH2p-S21. Se observan los porcentajes promedio de expresión nuclear de cada uno de los grupos (ANOVA $p = 0.00001$)

Se realizó la prueba de ANOVA para determinar si hay diferencias entre los promedios de los 3 grupos, en donde el resultado de dicha prueba indica que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el promedio de expresión nuclear de EZH2pS21 y los grupos de las muestras estudiadas, para determinar si hay diferencias estadísticamente significativas al comparar los 3 grupos analizados

Se realizó la prueba de Tukey, la cual indico que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los el grupo VPH-AR negativo y los grupos con VPH-AR positivo, pero no existen diferencias significativas entre los grupos VPH-AR positivo/p16-Ki67 negativo y VPH-AR positivo/p16/Ki67 positivo, por lo que se puede decir que el porcentaje de expresión nuclear de EZH2pS21 aumenta con la presencia del VPH-AR, sin embargo no hay una correlación directa entre los niveles de proteína de EZH2pS21 y la etapa de la infección de VPH-AR.

11. Discusión

Presencia de VPH-AR y características clínicas de mujeres tamizadas y referidas a clínica de displasia

En este estudio la población de tamizaje comprendió 4 estados del país, siendo dos de la Megalópolis de México (CDMX y Puebla), uno de la península de Yucatán (Quintana Roo), y uno del suroeste del país (Guerrero), se obtuvo en promedio una prevalencia de VPH-AR del 22.3%, dicho valor es cercano a los reportes publicados durante el año 2019, del 24.8% y 25.8% (Campos et al, 2019; Gutiérrez, et al 2019), y está entre el intervalo de lo publicado en años anteriores que oscilan entre el 8% y el 50% (Lazcano E, *et al.* 2010; Orozco A, *et al.* 2010). Cabe notar que la única institución pública que posee datos de tamizaje de CaCu por medio de detección de VPH-AR, es el Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva (CNEGSR), en su último reporte del 2017, tamizaron a 322,123 pacientes, e indicaron una prevalencia del 10.3 % a nivel nacional, en donde los estados con mayor prevalencia fueron Sonora (13.9%), Veracruz (12.6%), Coahuila (12.3%), y Yucatán (12.1%), donde ninguno de estos estados pertenecieron a nuestras poblaciones analizadas.

La CDMX ha sido una de las poblaciones más estudiadas en México en relación con el tamizaje de CaCu por medio de detección de VPH-AR, con valores entre 7 al 25 % (Piña *et al.* 2006; López, *et al.*, 2012; Caballero *et al.* 2017), aunque con técnicas de detección diferentes. En el presente estudio, se obtuvo un promedio del 18,1%. En Puebla la prevalencia fue del 16.7%, valor inferior a dos reportes anteriores del 25.4% y 25.2% (Velázquez, *et al.* 2009; Campos *et al.*, 2019), dichos reportes son de mujeres que carecen de seguridad social, que viven en poblaciones rurales alejadas de las principales ciudades de Puebla, mientras que en nuestro estudio la población es de mujeres con seguridad social, que radican en la segunda ciudad más habitada e importante de Puebla que es Tehuacán. Por lo que es esperado observar una mayor prevalencia de VPH-AR, ya que un bajo nivel educativo, carencia de infraestructura en el sector salud, y el acceso a los programas de vacunación y limitación al tamizaje, son características de poblaciones rurales (OMS, 2019).

En Guerrero, así como otros estados del sur del país, normalmente se han reportado una alta prevalencia de VPH-AR del 35.5%, y 37.6 % (Illades *et al* 2009; Colin *et al* 2010). En estos estudios la población analizada fue de la ciudad de Acapulco, mientras que en el presente estudio identificamos 15.2% de pacientes provenientes de la ciudad de Taxco. Es importante mencionar que diferencias poblacionales y la sensibilidad de las técnicas usadas para la detección de VPH son factores que pueden afectar la prevalencia de VPH. La técnica COBAS 4800® usada en este estudio es una prueba validada analítica y clínicamente, y que detecta solamente VPH de alto riesgo.

Por último, la sede de Quintana Roo específicamente Cancún, fue la que posee mayor prevalencia con 38%, dicho valor es superior a lo indicado en reportes anteriores del 15.8% y 21.2% (Navarro, *et al* 2018; Campos, *et al.* 2019). Es importante mencionar que en años reciente ha incrementado la tasa de incidencia y mortalidad a causa de CaCu en dicha entidad, en 2017 fue considerado como el segundo estado de la republica con la tasa más alta de mortalidad por CaCu del 17.7, siendo superado solamente por Chiapas con 19.7 (CNEGSR, 2017).

Se considera que estas diferencias porcentuales presentadas en cada una de las poblaciones y de manera general, pueden variar ampliamente, debido a las características sociodemográficas de la población analizada, la sensibilidad y especificidad de la técnica empleada, de la cantidad de muestra biológica utilizada y a la dinámica de movilidad de cada población (Brancaccio *et al.* 2018).

Se analizaron muestras de la CDMX, Puebla, Guerrero, y la península de Yucatán (Quintana Roo y Yucatán) de clínica de displasias. Las pacientes que acuden a estas clínicas, es por el hecho que obtuvieron en su reporte citológico un diagnóstico presuntivo de lesión intraepitelial bajo o de alto grado, o alteraciones celulares compatibles con VPH o CaCu, por lo que requieren una confirmación diagnóstica por colposcopia, y examen histopatológico de acuerdo con la NOM-014-SSA2-1994; por lo cual, hay mayor probabilidad de encontrar la presencia del VPH-AR en dichas muestras, ya que es el agente causal de lesiones precursoras de cáncer, así como de CaCu (Zur Hausen, 1994).

Los resultados indican que en general hubo una prevalencia de VPH-AR del 39.6%, dicho valor tal como se esperaba es superior al de las mujeres que acuden al programa de tamizaje del 22.3%, y está entre el intervalo a los análisis mostrados en años anteriores por diversos autores del 31 al 95% (Illades *et al.* 2010; Aguilar *et al*, 2015). Una limitante del trabajo es que no se obtuvieron los datos de la confirmación diagnóstica colposcópica e histopatológica. Sin embargo, el hecho de que la prevalencia de las muestras procedentes de las clínicas de displasias sea tan variable, se puede deber a diferencias en la eficiencia del diagnóstico mediante Papanicolaou, ya que es en base a dicho resultado que se refieren las pacientes a clínica de displasias. Por otra parte, hasta el 50% de las lesiones de bajo grado, sufren un proceso de aclaramiento

de forma natural por el sistema inmune, en un tiempo no máximo de 12 meses (Melnikow, *et al.* 1998). La NOM-014-SSA2 indica que las pacientes deben recibir su resultado del PAP máximo 10 días después de su toma de muestra, y ser remitidas a una clínica de displasias máximo en un lapso de 3 meses, a pesar de ello desafortunadamente el flujo de trabajo en sistema de salud es muy lento, por lo que, al llegar a una clínica de displasias como alguna de nuestro estudio, posiblemente lleguen con la infección resuelta, arrojando un resultado negativo o un estadio más avanzado de la enfermedad. A esto también se le suma el hecho que el diagnostico presuntivo antes de ser remitidas a la clínica de displasias es exclusivamente a través del PAP, el cual detecta una minoría de las infecciones por VPH AR, y un gran número ASCUS, el cual es un resultado ambiguo al no esclarecer si es una lesión maligna, o cambios inflamatorios relacionado a diversas causas, se ha estimado que hasta el 60% de los reportes de PAP poseen este resultado (Catteau, *et al* 2014). De acuerdo con los resultados de este estudio, 60% de las pacientes referidas a las clínicas de displasias no tienen VPH-AR, esto es relevante, ya que una de las opciones de triage para tamizaje basado en PAP, es precisamente la detección de VPH-AR y de ser posible con genotipificación de VPH 16 y 18

En relación a la distribución de los genotipos de VPH AR, tanto en pacientes de tamizaje como de clínica de displasias, con un 77% y 69.3% respectivamente, son más frecuentes otros genotipos de alto riesgo diferentes a 16 y 18, que incluyen a los genotipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, en otros estudios realizados anteriormente en diversas poblaciones de tamizaje también se han reportado que 70% y 77.5% es la prevalencia de otros VPH AR (CNEGSR, 2017). El genotipo 16 ha sido reportado como el más prevalente en diversas regiones del mundo incluyendo a México, tanto en muestras normales, así como con displasias (IARC/ICO. 2018), la prevalencia de este genotipo en este estudio fue del 13.1% en la población de displasias y del 8.8% en la población de tamizaje.

Dado a las limitaciones de la técnica empleada no se puede saber la combinación exacta de los genotipos identificados en el grupo de otros VPH-AR, ya que solo detecta los genotipos 16, 18 y un pool conformado por 12 genotipos de alto riesgo. Las infecciones múltiples que pudieron ser identificadas, fueron al menos del 9.8 % en tamizaje y 14.5% en clínica de displasias, siendo la coinfección de VPH 16 junto con otro de alto riesgo la más frecuente en ambas poblaciones. Se estima que en México varía entre el 8% y el 30% de mujeres positivas a VPH que están infectadas simultáneamente por otros genotipos ya sea de alto o bajo riesgo (Cheturvedi, *et al* 2005; Velázquez *et al* 2009; Aguilar *et al* 2015; Gutiérrez, *et al* 2019). La prevalencia de las coinfecciones en CaCu es menor (3-44% del total de casos) que las mono infecciones, pero algunos estudios han demostrado que generan un valor pronostico peor hacia la paciente, ya que se asocian a una mayor recurrencia tumoral, menor sobrevida, y a una mala respuesta de terapia (Bachtiary, *et al* 2002; Kaliff *et al* 2018).

Aún no está claro, si hay una asociación positiva o negativa de las infecciones múltiples, pero se ha demostrado, que una infección de VPH-AR en curso, puede ser un factor de riesgo para adquirir a corto plazo una infección adicional de VPH y con ello generar una infección persistente, que al ser sinérgica aumenta los efectos oncogénicos, por lo cual, pudiese desencadenar en menor tiempo lesiones precursoras o CaCu (Rousseau, *et al* 2001), esto también se relaciona con el hecho que en las coinfecciones la carga viral es mayor que en las mono infecciones, lo cual favorece la integración al genoma y la progresión de la lesión (Manawapat *et al*, 2018). Para poder refutar las aseveraciones de los autores antes citados y extrapolar a nuestro estudio, es importante utilizar otro método de genotipificación, para determinar cuál es la distribución exacta del grupo de otros VPH-AR, de esta manera establecer la prevalencia de la combinaciones de los genotipos en nuestras poblaciones estudiadas, además de darles el seguimiento a corto y largo plazo a las pacientes, para conocer el efecto de las infecciones múltiples en nuestra población mexicana estudiada, y así estimar el riesgo que poseen de desarrollar un avance en las lesiones o CaCu.

En relación a las características clínicas, la edad fue un factor de riesgo que se asoció estadísticamente al resultado de VPH-AR en el programa de tamizaje (Quintana Roo, Guerrero y CDMX) y en clínica de displasias (Guerrero y CDMX) normalmente a la edad a la cual se observa un pico de la prevalencia de VPH AR, es posterior al inicio de la vida sexual que es alrededor de los 20 años, y conforme avanza la edad se observa un efecto de meseta en edades medias, y después una disminución paulatina y progresiva conforme avanza la edad, por lo tanto, al analizar poblaciones jóvenes, la probabilidad de tener una alta prevalencia de infección por VPH es mayor (Melkert *et al*. 1993; Bruni, *et al* 2010). Sin embargo, también se ha observado que se genera un segundo pico de casos de prevalencia de casos positivos a VPH-AR en el rango de 55 a 64 años, esto se observó exclusivamente en nuestra población de la clínica de displasias, este pico de prevalencia se debe a que en este rango de edad es común que ocurra una reactivación de los virus latentes posiblemente por la senescencia del sistema inmune, y además un gran porcentaje de los diagnósticos de CaCu ocurre en un media de edad de 49 años (Herrero, *et al* 2000)

En la población de tamizaje general y en la sede de CDMX, se determinó que las mujeres positivas a VPH-AR inician principalmente su vida sexual antes de los 18 años, esto es un factor de riesgo porque durante ese rango de edad hay inmadurez biológica cervical, así como cambios epiteliales producidos por la influencia estrógenica, además se ha determinado que en las primeras relaciones sexuales durante la adolescencia, no se utilizan métodos anticonceptivos de barrera como el condón (Edelstein *et al* 2009; Louie *et al*, 2009).

Al ser la infección de VPH una enfermedad de transmisión sexual, a mayor número de parejas sexuales, mayor probabilidad de una infección, además no solo se involucra con su comportamiento sexual individual, sino también con el de su(s) pareja(s) sexuales (Burk, *et al.* 1996). Esta variable como factor de riesgo se observó en la población de clínica de displasias específicamente en la sede de Puebla, además en la población del programa de tamizaje en las sedes de Guerrero y CDMX, en donde la positividad al VPH se relaciona con haber tenido 4 parejas sexuales o más.

En relación al número de embarazos, se ha comprobado que un mayor número de embarazos a término, hay mayor probabilidad de una infección por VPH, y el desarrollo de CaCu, tener más de 5 embarazos genera hasta el doble el riesgo del desarrollo de lesiones de alto grado y 15 veces el desarrollo de CaCu, esto se debe a los cambios hormonales durante el embarazo, la mayor exposición de la zona de transformación, y el aumento de traumas en el cérvix a causa del parto (Piña, *et al* 2006; Elson *et al*, 2000). Sin embargo, en nuestro estudio en la sede de Puebla del programa de tamizaje y la población de displasias de la sede de Guerrero, determinamos que las mujeres sin antecedentes de embarazo presentaban un mayor porcentaje de casos positivos a VPH-AR en comparación con mujeres que se habían embarazos con anterioridad. Por lo que la presencia de VPH puede relacionarse a otros factores de riesgo.

El consumo de tabaco de manera crónica, aumenta potencialmente el riesgo de infección por VPH, por su propio efecto carcinogénico, y a través de un deterioro local de la inmunidad celular, mediante la inhibición de la actividad de las células T y NK, así como la supresión de la producción de anticuerpos específicos contra el VPH, aunque esto viene relacionado con la dosis de tabaco consumida al día, (Kalra *et al*, 2000), aquí se determinó que solo en la población de la clínica de displasias hay una asociación estadísticamente significativa de la positividad de VPH al consumo de tabaco.

Cambios de expresión en HOXC11 y EZH2 en muestras cervicovaginales

HOXC11 es parte de la familia de los genes *HOX* que codifican factores de transcripción que regulan el desarrollo embrionario, durante esta etapa estimula la proliferación y la supervivencia de las células progenitoras, sin embargo, durante la etapa adulta su expresión es baja en la mayoría de los tejidos normales, pero se ha demostrado que cuando este se sobre expresa promueve aberrantemente la proliferación, contribuyendo a el proceso carcinogénico, por lo que se ha asociado a diversos tipos de cáncer como mama, renal, cervicouterino, glioblastoma, pulmón y colon rectal (López *et al* 2006; Fennell *et al* 2019; Wang *et al* 2019).

HOXC11 en cáncer se asocia, a la resistencia a fármacos como tamoxifeno en el tratamiento endocrino en cáncer de mama, al regular junto con el coactivador del receptor de esteroides p160 (*SCR1*) a la proteína S100 beta (McIlroy *et al* 2010), y a una mala respuesta a terapia en CaCu y glioblastoma al relacionarse a la persistencia o recurrencia de la actividad tumoral o muerte durante el seguimiento a 5 años (Ríos 2015; Eoh *et al* 2019), por todo lo ya mencionado, su expresión en cáncer está relacionada a la supervivencia de los pacientes, por lo cual puede servir como un blanco terapéutico y/o biomarcador de mal pronóstico (Liu *et al* 2015; Sun *et al* 2019).

En reportes anteriores solo se ha analizado la expresión de *HOXC11* en líneas celulares, epitelio cervical normal y en cáncer, pero no en etapas iniciales y de transformación a casusa del VPH-AR, por lo cual nuestro estudio se basó en este tipo de muestras (López *et al* 2006; Ríos 2015; Eoh *et al* 2019).

En el presente estudio, identificamos un incremento en la expresión de *HOXC11* a nivel de proteína en muestras con infección a VPH-AR, pero no en muestras negativas a este virus, esto coincide con lo antes publicado que indican que *HOXC11* al igual que otros genes del *cluster HOXC* (9, 12, 13) no presenta expresión en tejido cervical normal, pero si una transcripción altamente activa en CaCu, por lo que en dicho estudio han sugerido a este gen como un candidato para ser biomarcador molecular de CaCu (López *et al* 2006).

Se han demostrado que la sobre expresión de este gen, se debe a que la oncoproteína E7 del VPH-AR en especial los genotipos 16 y 18, ocasiona diversas alteraciones genéticas y epigenéticas en el ADN e histonas, modificando la expresión y función normal de las metiltransferasas (*EZH2* y *DNMT1*), y desmetilasas de histonas (*KDM6A/B*), se ha encontrado un enriquecimiento concomitante de las marcas H3K4me3 y H3K27me3, pero un mayor enriquecimiento para las marcas H3K4me3 en comparación con las marcas H3K27me3, e hipometilación del ADN en la región promotora, lo cual es indicativo de activación de la transcripción de este gen. (McLaughlin *et al* 2011; Hyland *et al* 2011; Ríos 2015; Saha *et al* 2017)

Con los datos presentados la expresión proteica de *HOXC11* es aumentada por la presencia virus, además de que hay muestras negativas a VPH-AR que presentan la expresión de dicha proteína, pero se encontraron que existen diferencias significativas entre los 3 grupos analizados, por lo que se puede decir que el porcentaje de expresión nuclear de *HOXC11* aumenta con la presencia del VPH-AR, por lo cual al presentarse en células en transformación podría estar involucrado en el desarrollo de lesiones precursoras y CaCu pero se deben realizar más estudios con una población más grande para determinar cómo se relaciona *HOXC11* con la progresión de CaCu.

Las diversas alteraciones epigenéticas en el ADN y en las histonas, causadas por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH AR, comienzan desde etapas tempranas de la enfermedad en las lesiones precursoras, y van progresando conforme avanza la enfermedad hasta desencadenar CaCu, por lo cual, en la actualidad se propone a las enzimas *EZH2*, *KDM6A/B* y *DNMT1*, que producen modificaciones epigenéticas, así como el resultado de dichas modificaciones (metilación del ADN e histonas), como posibles marcadores moleculares diagnósticos y pronósticos de lesiones precursoras y CaCu. (McLaughlin et al 2011; Wentzensen et al 2009). A pesar de que hay incremento de *EZH2*, se ha observado la pérdida del porcentaje de H3K27me3 *in vitro* e *in vivo* en LIEAG y CaCu, que afectan la reprogramación epigenética de genes *HOX* dirigidos por H3K27me3, lo cual se debe principalmente por la fosforilación de *EZH2* en la Serina 21 (*EZH2p S21*) por la vía *AKT*, altamente activa en células infectadas por VPH-AR, generando cambios estructurales y funcionales en dicha enzima (Hylan P, et al 2011). Se han observado altos niveles de *EZH2p S21* en queratinocitos infectados por VPH 16, pero aun así hasta la fecha este es el primer reporte de *EZH2p S21* en lesiones precursoras de muestras clínicas, para determinar su expresión en etapas tempranas de la infección.

Estudios anteriores han demostrado que *EZH2* posiblemente puede ser empleado como un biomarcador de lesiones precursoras y CaCu, ya que posee una baja expresión en tejido cervical normal, y conforme avanza la enfermedad también aumenta su concentración, pero también existen evidencias de que no hay correlación directa entre los niveles de la proteína y el grado de malignidad de la lesión (Holland et al 2008; Wijetunga, et al 2016), por lo cual se cree que la proteína fosforilada puede ser más específica dependiendo del grado de la lesión. Los resultados en este trabajo demuestran que *EZH2p S21* se encuentra expresado en las líneas celulares SiHa y Caski, así mismo esta expresado en muestras negativas y positivas a VPH-AR, pero también se encontró que *EZH2p S21* está sobre expresados en muestras cervicales compatibles con lesiones precursoras (p16+/Ki-67+) por lo cual podrían estar relacionadas a la progresión de CaCu, esto se podría deber a que la ruta PI3K-AKT es activada desde la unión del virión con la célula, que permite la internalización y entrada al virus a la célula, por lo cual se puede indicar que la actividad de la enzima *EZH2* se ve afectando desde etapas iniciales de la infección (Raff, et al, 2013).

12. Conclusiones

En ambos grupos de estudio (tamizaje y displasia) 7 de cada 10 muestras positivas a VPH son de genotipos de alto riesgo diferentes a 16 y 18.

Las infecciones múltiples representan al menos el 10% del total de las infecciones de VPH AR.

Hasta el 60% de las mujeres que son remitidas a la clínica de displasias por medio del PAP no presentan infección por VPH AR. Por lo que se debe analizar el resultado diagnóstico confirmatorio de los casos VPH negativos.

La asociación del consumo de tabaco y uso de métodos anticonceptivos hormonales como factores de riesgo para la infección e VPH, solo fue identificado en muestras referidas a la clínica de displasias.

Haber tenido 4 o más parejas sexuales, tener menos de 24 años o más de 50 años, se asocia a la presencia del VPH-AR independiente de la población y grupo estudiado

La presencia de VPH-AR en ambas poblaciones se asoció estadísticamente al rango de edad, número de embarazos y al haber tenido más de 4 parejas sexuales.

HOXC11 y EZH2pS21 están sobre expresados en muestras cervicales compatibles con lesiones precursoras (p16+/Ki-67+) por lo cual podrían estar relacionadas a la progresión de CaCu.

13. Perspectivas

Analizar el resultado del PAP y del diagnóstico confirmatorio de las muestras cervicovaginales provenientes de clínica de displasias.

Evaluar por medio de PCR en tiempo real la expresión de los genes HOXC11 y EZH2 en muestras cervicovaginales positivas y negativas a VPH-AR.

Evaluar la expresión de HOXC11 y EZH2 por medio de inmunohistoquímica y PCR en tiempo real en muestras de CaCu,

Identificar las características clínicas y frecuencia de VPH-AR en otros estados de la república para compararlos con los datos aquí presentados.

14. Bibliografía

1. Adam E, Berkova Z, O, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH. (2000) Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am J Obstet Gynecol.* 182(2):257-64
2. Aguilar A., Vallejo V. Cortés E., Salgado M. E., Ramo, N. P., Ortega L. Arias-Flores, R., Medina-Díaz, I. M., Hernández-Garza, F., Santos-López, G., Piña-Sánchez, P. and (2015), Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: Type-specific prevalence and HPV coinfections. *J. Mes. Virol.*, 87: 871-884.
3. Aguilar A, Vallejo V, (2015) Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: type-specific prevalence and HPV coinfections. *Med Virol*, 87(5): 871-884.
4. Alarcon L, Illades B, Vejar A, Lopez Z, Fernandez G, Muñoz J, Flores E, (2010) Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico, *Gynecology Oncology*, 117(2): 291-296.
5. Allia E, Ronco G, Coccia A, Luparia P, Macrì L, Fiorito C, Maletta F, Deambrogio C, Tunesi S, De Marco L, Gillio-Tos A, Sapino A, Ghiringhello B. (2015) Interpretation of p16(INK4a) /Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive women by experts and nonexperts in cervical cytology. *Cancer Cytopathol*; 123(4):212-218.
6. Alvarado-Ruiz L, Martinez-Silva MG, Torres-Reyes LA, et al. HOXA9 is Underexpressed in Cervical Cancer Cells and its Restoration Decreases Proliferation, Migration and Expression of Epithelial-to-Mesenchymal Transition Genes. (2016) *Asian Pac J Cancer Prev.*;17(3):1037-1047.
7. Amador A, Hernandez J, (2013) Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response, *Rev Viruses*, 5(11), 2624-2642.
8. American Cancer Society (2019) The PAP Test. Recuperado de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/prevencion-y-deteccion-temprana/prueba-de-papanicolaou.html>
9. Atlas Genetics Oncology (2019) HOXC11, inisit, Recuperado de http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_HOXC11.html el 7 de octubre del 2019.
10. Bachtiry B, Obermair A, Dreier B, Birner P, Breitenecker G, Knocke TH, Selzer E, Pötter R. (2002) Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer*; 102 (3):237–243.
11. Banks Human, Pim D, Thomas M (2012) tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer, *Rev Nature*, 12: 877-886.
12. Bergvall M, & Melendy T, (2013) The E1 proteins. *Virology*, 445(1):197-204.
13. Biryukov J & Meyers C (2018) Superinfection Exclusion between Two High-Risk Human Papillomavirus Types during a Coinfection, *Journal of Virology*, 92(8).
14. Bierkens M., Hesselink A.T., Meijer C.J., Heideman D.A., Wisman G.B., van der Zee A.G. (2013) CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. *Int J Cancer*;133:1293–1299.
15. Bobadilla M, Zorillo M, Villagra V, Olmedo G, Roscher G, Franco F, Riveros M, Gómez M, Llamosas F (2015) Detección molecular del virus papiloma humano de alto riesgo oncogénico en muestras cervicales. Laboratorio Central de Salud Pública. Primeros Resultados. *Rev Inst. Ciencia de la Salud.* 13 (1).
16. Bruni L, Mireia Diaz, Mireia Castellsagué, Elena Ferrer, F. Xavier Bosch, Silvia de Sanjosé, (2010) Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 202: 1789–1799.
17. Buck C, Day P, Trus B (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445(1):169-174.
18. Bui TC, Thai TN, Tran LT, Shete SS, Ramondetta LM, Basen-Engquist KM. (2016) Association Between Vaginal Douching and Genital Human Papillomavirus Infection Among Women in the United States. *J Infect Dis.*;214(9):1370-1375

19. Burk RD, Ho GY, Beardsley L (1996) Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J. Infect. Dis*; 174(4): 679 – 89.
20. Burgers, W. A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T., & Fuks, F. (2007). Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene*, 26(11), 1650–1655.
21. Caballero H, Palacios G, Castillo M, Hernández A, Medina F (2017) Prevalencia y tipificación de genotipos de virus del papiloma humano en mujeres del área metropolitana del Valle de México, *Rev de ginecología y obstetricia en México* (85)12.
22. Campos-Romero, A., Anderson, K. S., Longatto-Filho, A., Luna-Ruiz Esparza, M. A., Morán-Portela, D. J., Castro-Menéndez, J. A., Alcántar-Fernández, J. (2019). The burden of 14 hr-HPV genotypes in women attending routine cervical cancer screening in 20 states of Mexico: a cross-sectional study. *Scientific reports*, 9(1).
23. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M. (2013) NTCC working group. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*;14(2):168-176.
24. Castro J, Hernández C, Madrid C (2011) La anticoncepción hormonal como factor de riesgo para cáncer Cervicouterino: evidencias biológicas, inmunológicas y epidemiológicas. *Rev Ginecol Obst Mex.* 79 (9):533- 539
25. Catteau X, Simon P, Noël JC. (2014) Evaluation of the oncogenic human papillomavirus DNA test with liquid-based cytology in primary cervical Cancer screening and the importance of the ASC/SIL ratio: a Belgian study. *ISRN Obstet Gynecol*.
26. Christofides A, Karantanos T, Bardhan K, Boussiotis VA. (2016) Epigenetic regulation of cancer biology and anti-tumor immunity by EZH2, *Oncotarget*, 7(51): 85624–85640.
27. CNEGSR (2017) Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/cnegsr> el 16 de Noviembre del 2019.
28. Colín-Ferreira, M. del C., Domínguez-García, M. V., Mendieta-Zerón, H., Camarillo-Romero, M. del S., Pérez-Rogel, M., Martínez-Madrigal, M., ... Romero-Figueroa, M. del S. (2019). *Genotyping of the human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions in Mexican women. Japanese Journal of Infectious Diseases.* doi:10.7883/yoken.jjid.2019.289
29. Colin O, Garcia C, (2010) Geographical variation in human papillomavirus prevalence in Mexican women with normal cytology, *Internacional Journal of intectious diseases* (14)12:1082-1087
30. Comino R, Hernandez J, Sanchez A (2015) Valor de p16 en el cribado y diagnóstico de las lesiones del cérvix uterino
31. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2013;382(9895):889-899. doi:10.1016/S0140-6736(13)60022-7
32. Cui Y, Zhang C, Wang Y, Ma S, Cao W, Guan F. (2020) HOXC11 functions as a novel oncogene in human colon adenocarcinoma and kidney renal clear cell carcinoma. *Life Sci.*;243:117230.
33. Cuylen S, Politi A, Muller T, Neuman R, Poser I, Hyman A, Gerlich D, (2016) Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes, *Rev Nature*, 535: 308-312.
34. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, et al. (2013) The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, *Lab Med* ;137(6):738.
35. De la fuente D, Guzmán S, Barboza O (2010) Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Rev medicina universitaria.* 12(49): 231-238.
36. De SanJose, Díaz M, Bruni L, Muñoz N (2007) Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet, Infect Dis*.
37. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology.*;324(1):17-27.
38. Doorbar J (2013) The E4 protein, *Virology*, 445(1): 80-98.
39. Doorbar J, Ely S, Sterling J, (1991) Specific interaction between HPV 16 E1 - E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 352: 824–7.

40. Doorbar J (2012) the Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, 30(5): 55-70.
41. Douglas H, Weinberg R (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 14.
42. Eoh, K. J., Kim, H. J., Lee, J. Y., Nam, E. J., Kim, S., Kim, S. W., & Kim, Y. T. (2017). Upregulation of homeobox gene is correlated with poor survival outcomes in cervical cancer. *Oncotarget*, 8(48), 84396–84402.
43. Flores L, Zamora S, Salazar E, Lazcano E (2000) Análisis de supervivencia. Aplicación en una muestra de mujeres con cáncer cervical en México. *Salud pública de México*.
44. Gallegos-Bolaños J, Rivera-Domínguez JA, Presno-Bernal JM, Cervantes-Villagrana RD. High prevalence of co-infection between human papillomavirus (HPV) 51 and 52 in Mexican population. *BMC Cancer*. 2017;17(1):531. Published 2017 Aug 8. doi:10.1186/s12885-017-3519-7
45. Giroglou T, Sapp M, Lane C, Fligge C, Christensen ND, Streeck RE, Rose RC (2001) Immunological analyses of human papillomavirus capsids *Vaccine*. (13-14):1783-93.
46. Gissmann L, Pfister H, Zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology*. 1977;76(2):569-580.
47. Globocan (2018) Cancer today, World Health Organization. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/home> el 10 de septiembre del 2019.
48. González M, Rosado I, Valdez N, Puerto M (2004) High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *Journal of Clinical Virology*, 29(3), 203–206. doi:10.1016/s1386-6532(03)00138
49. Guardado M, Juárez E, Romá E, Medina I, Alfaro A, Benuto RE, Dean M, Villegas N, Berumen J. (2014) The Distribution of High-Risk Human Papillomaviruses Is Different in Young and Old Patients with Cervical Cancer, *PLoS one*, (9)10.
50. Guidry, J. T., & Scott, R. S. (2017). The interaction between human papillomavirus and other viruses. *Virus research*, 231, 139–147.
51. Gutiérrez L, De la fuente D, (2014) Biología molecular para el diagnóstico del cáncer Cervicouterino, *Gaceta mexicana de oncología*, 13(4): 25-32.
52. Gutiérrez, R, Malacara Rosas, A., Gutiérrez Santillán, E., Delgado Gutiérrez, M., Torres Orozco, R. E., García Martínez E, Rosa, A. (2019). Unusual prevalence of high-risk genotypes of human papillomavirus in a group of women with neoplastic lesions and cervical cancer from Central Mexico. *PLoS one*, 14(4).
53. Hernández C, Smith J, Lorincz A, Arrerola E, Lazcano E, Hernández M (2005) Prevalencia de infección por virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo y factores asociados en embarazadas derechohabientes del IMSS en el estado de Morelos, *Salud pública de México* (47)6.
54. Hernández S, Apresa T, Patlán R. (2015) Panorama epidemiológico del cáncer Cervicouterino. *Rev. Med Inst Mex Seguro Soc.*, 53(2): 154-161.
55. Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M. E., Hutchinson, M., Morales, J., Balmaceda, I., Greenberg, M. D., Alfaro, M., Burk, R. D., Wacholder, S., Plummer, M., & Schiffman, M. (2000). Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(6), 464–474.
56. Holland D, Hoppe-Seyler K, Schuller B, Lohrey C, Maroldt J, Dürst M, Hoppe-Seyler F. (2008) Activation of the *Enhancer of Zeste Homologue 2* Gene by the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein. *Cancer research*, 68(23).
57. Hostikka SL, Capecchi MR. (1998) The mouse Hoxc11 gene: genomic structure and expression pattern. *Mech Dev*;70(1-2):133-145.
58. Hyland, P. L., McDade, S. S., McCloskey, R., Dickson, G. J., Arthur, K., McCance, D. J., & Patel, D. (2011). Evidence for alteration of EZH2, BMI1, and KDM6A and epigenetic reprogramming in human papillomavirus type 16 E6/E7-expressing keratinocytes. *Journal of virology*, 85(21), 10999–11006.
59. IARC (2012) Biological agents. A review of human carcinogens. Volume 100 B. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2012; 100: 1–441
60. ICO/IARC (2019) Human Papillomavirus and Related Diseases Report- México, HPV information centre, Recuperado de <https://www.hpvcentre.net/statistics/reports/MEX.pdf?t=1573829348808> el 15 de Noviembre del 2019.
61. Illades B, Alarcon L, Véjar V, Zamudio N, Sales N, Flores E, Fernández G, Vences A, Muñoz JF, Leyva MA. (2009) Prevalence and distribution of human papillomavirus

- types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecology oncology*, 117(2): 291-296.
62. Illades B, Alarcon L, Véjar V, Zamudio N, Sales N, Flores E, Fernández G, Vences A, Muñoz JF, Leyva MA. (2009) Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors, *Cancer Detec Prev* (32)4
 63. Instituto Nacional de Cáncer (2018) Vacuna contra el virus del papiloma humano. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infecciosos/hoja-informativa-vacuna-vph#r5>, del 12 de septiembre del 2019.
 64. Jin-zhi, Yan Y, Wang XX, Jiang Y, Xu HE (2014) EZH2: biology, disease, and structure-based drug Discovery, *Acta Pharmacologica Sinica*, 35: 161–174.
 65. Kaliff, M., Sorbe, B., Mordhorst, L. B., Helenius, G., Karlsson, M. G., & Lillsunde-Larsson, G. (2018). Findings of multiple HPV genotypes in cervical carcinoma are associated with poor cancer-specific survival in a Swedish cohort of cervical cancer primarily treated with radiotherapy. *Oncotarget*,
 66. Kalra R, Shashi P. Singh, Susan M. Savage, Gregory L. Finch and Mohan L. Sopori (2000) Effects of cigarette smoke on immune response: chronic exposure to cigarette smoke impairs antigen-mediated signaling in T cells and depletes IP3-sensitive Ca (2+) stores. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293 (1) 166-171.
 67. Killeen JL, Dye T, Grace C, Hiraoka M. (2014) Improved abnormal Pap smear triage using cervical cancer biomarkers. *J Low Genit Tract Dis.*;18(1):1-7
 68. Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. (1995) Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature*; 375(6531): 506-10
 69. Kotake Y., Cao R., Viatour P., Sage J., Zhang Y., Xiong Y. (2007) *Genes Dev.* 21, 49–54.
 70. Kovayashi A, Hisamatsu K, (2018) Review of HPV-Related Head and Neck Cancer, *Journal of clinical medicine* 7(9): 241.
 71. Kjaer S, Nygard M, Dillner J, Brooke J, Radley D, Li M, Munk C, Hansen BT, Sigurdardottir LG, Hortlund M, Tryggvadottir L, Joshi A, Das R, Saah AJ. (2018) A 12-Year Follow-up on the Long-Term Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine in 4 Nordic Countries. *Clinical Infectious Diseases.* 66(3): 339-345.
 72. Kuzmichev, A., Margueron, R., Vaquero, A., Preissner, T. S., Scher, M., Kirmizis, A., Ouyang, X., Brockdorff, N., Abate-Shen, C., Farnham, P., & Reinberg, D. (2005). Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), 1859–1864. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409875102>
 73. Lazcano E, Herrero R, Muñoz N (2001) Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology, *Internacional Journal of Cancer* (3)91: 412-420.
 74. Lazcano-Ponce E, Lörincz AT, Salmerón J, et al. A pilot study of HPV DNA and cytology testing in 50,159 women in the routine Mexican Social Security Program. *Cancer Causes Control.* (2010);21(10):1693–1700. doi:10.1007/s10552-010-9598-2
 75. Lai, H. C., Ou, Y. C., Chen, T. C., Huang, H. J., Cheng, Y. M., Chen, C. H., Chu, T. Y., Hsu, S. T., Liu, C. B., Hung, Y. C., Wen, K. C., Yu, M. H., & Wang, K. L. (2014). PAX1/SOX1 DNA methylation and cervical neoplasia detection: a Taiwanese Gynecologic Oncology Group (TGOG) study. *Cancer medicine*, 3(4), 1062–1074.
 76. Leonard SM, Wei W, Collins SI, Pereira M, Diyaf A, Constandinou-Williams C, Young LS, Roberts S, Woodman CB. (2012). Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis.* 33(7):1286-93.
 77. Li, X., & Coffino, P. (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *Journal of virology*, 70(7), 4509–4516.
 78. Lindsay C, Harris J, Harris J, O'Connell DA, Seikaly H, Biron VL (2017) Efficacy of EZH2 inhibitory drugs in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Clinic epigenetics*: 9(95).
 79. Liu Y, Liu T, Bao X, He M, Li L, Yang X. (2014) Increased EZH2 expression is associated with proliferation and progression of cervical cancer and indicates a poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol.* ;33

80. Longo, M.C., Berninger, M.S. & Hartley, J.L. (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 93:125-128.
81. López R, Garrido E, Piña P, et al. HOXB homeobox gene expression in cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(1):329-335.
82. López R, Garrido E, Vázquez G, et al. A subgroup of HOX Abd-B gene is differentially expressed in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(3):1289-1296
83. Lopez R, Medel M, Villalba J, Sánchez V (2012) Prevalence of Human Papillomavirus in Women from Mexico City, *Infect Dis Obstet Gynecol*.
84. López R, Marrero D (2014) El papel de los genes del desarrollo tipo HOX en el cáncer Cervicouterino, *Rev. IMSS*, 52(2) 188-193.
85. López S, & Saberon L (2006) Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Revista de oncología*, 1(1) :31-35
86. Mantovi F, & Banks L (2001). The human papillomavirus E6 protein, *Oncogene*. 20: 7874-87.
87. Louie, K. S., de Sanjosé, S., Diaz, M., Castellsagué, X., Herrero, R., Meijer, C. J. (2009). Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *British Journal of cancer*, 100(7), 1191–1197.
88. Mark M, Rijli F, Chambon P (1997) Homeobox Genes in Embryogenesis and Pathogenesis, *Rev pediatric research*, 42: 421-429.
89. Martínez-Portilla, R. J., López-Velázquez, J. L., Martínez-Rojas, G. C., Aguilar-Villagómez, M. I., De la Torre-Rendón, F. E., & Villafán-Bernal, J. R. (2016). Prevalencia de genotipos de alto riesgo de VPH detectados por PCR en pacientes con citología normal del Hospital Regional Adolfo López Mateos, ISSSTE [Prevalence of HPV high-risk serotypes detected by PCR in patients with normal cervical cytology at the Hospital Regional Adolfo López Mateos, ISSSTE]. *Ginecología y obstetricia de Mexico*, 84(9), 556–561
90. Mcllroy M, McCartan D, Early S, Peadar Ó Gaora, Pennington S, Arnold D.K. Hill and Leonie S. (2010) Young Interaction of Developmental Transcription Factor HOXC11 with Steroid Receptor Coactivator SRC-1 Mediates Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer. *Cancer research* 70(4) 1585-1594;
91. McBride A (2013) The papillomavirus E2, *Virology*. 445(1)
92. McLaughlin-Drubin, M. E., Crum, C. P., & Münger, K. (2011). Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
93. Melnikow J, Nuovo J, (1998) Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecology*; 92(4 Pt 2):727-35
94. Mello V, Sundstrom RK. Cancer, Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
95. Mendez F, Munoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, van den Brule AJ, Ronderos M, Meijer C, Munoz A. (2005) Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis*.
96. Montoya M, Rojo W, (2008) Prevalencia y factores asociados con infección por virus del papiloma humano cervical en pacientes con artritis reumatoide. *Rev. de Ginecología y obstetricia en México* 76(1): 9-17
97. Moreno V, Bosh X, et al (2002) Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in woman with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case control study. *The lancet*; 359: 1085-1092
98. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006;24 (Suppl 3): S3:42-51.
99. Muñoz N, Bosh X, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The new England journal of medicine*, 343: 518-52
100. Munger k, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. (2001) Biological activities and molecular target of human papillomavirus E7 oncoprotein, *Oncogen*, 20
101. Nava M (2014) p16INK4 as a Biomarker in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma, *Bentham Science publishers*

102. Navarro-Vidal, E., Hernandez-Rosas, F., Rey, M., & Flores-Peredo, L. (2018). Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes in Women from Cozumel, Mexico. *Asian Pacific Journal of cancer prevention: APJCP*, 19(9), 2417–2422.
103. Nitya G, Berguelin W, Guilino L, (2018) EMERGING DRUG PROFILE. Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Inhibitors, *Leuk lymphoma*, 59(7): 1574-1585
104. NCCN (2013) Nacional Comprehensive Cancer Network. Recuperado de <https://www.nccn.org/> el 14 de noviembre del 2019
105. NOM-014 SSA2 1994 “Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cérvico uterino, Diario Oficial de la federación, México, 2 de marzo de 1998.
106. Ochoa F (2014) Virus del papiloma humano. Desde su descubrimiento hasta el desarrollo de una vacuna. *Gaceta oncológica mexicana*, 13(5), 308-315
107. OMS (2016) Control integral del cáncer cervicouterino, Guía de prácticas esenciales.
108. Organización Panamericana de la Salud (2016) Incorporación de la prueba del virus del papiloma humano en programas de prevención de cáncer Cervicouterino, Argentina, Buenos Aires: Ed OPS.
109. Peralta-Rodríguez R, Romero-Morelos P, Villegas-Ruiz V, et al. Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: meta-analysis. *Infect Agent Cancer*. 2012;7(1):34. Published 2012 Dec 3. doi:10.1186/1750-9378-7-34
110. Pérez A, & Habich D (2016) Triage en el Screening Molecular del Cáncer de Cuello Uterino: Diferentes opciones, Nuevas oportunidades, *Rev. Fasgo Ciencia* (15) 2: 73-89.
111. Pett M, Coleman N. (2007) Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol*. 212(4):356-67.
112. Piña P, Hernandez M, López R, Vázquez G, Pérez C, Lizano M, González JL, Cruz F, Salcedo M. (2006) Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. *Int J Gynecology Cancer*. 16(3):1041-7.
113. Poppe WA, Ide PS, Drijkoningen MP, Lauweryns JM, Van Assche FA. (1995) Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. *Gynecol Obstet Invest* 39(1):34-8.
114. Raff A, Woodham A (2013) The Evolving Field of Human Papillomavirus Receptor Research: A Review of Binding and Entry, *Journal of virology*, 87(11): 6062–6072.
115. Ríos M (2015) Perfil de metilación de los genes hox y su asociación con la respuesta a tratamiento en cáncer cérvico uterino, UNAM.
116. Richart M (1973) Cervical Intraepithelial neoplasia. *Pathol Ann*, 8:302-328
117. Rivera R, Delgado J, Painel V, Barrero R, Larrain A (2006) Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical, *Rev. Chil obstet ginecol* (71)2: 135-14.
118. ROCHE (2018) Delivering confidence with every result on cobas® 4800/6800/8800 Systems. ROCHE Recuperado <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-hpv.html#productInfo> el 13 de septiembre del 2019.
119. Saha, S. S., Chowdhury, R. R., Mondal, N. R., Roy, S., & Sengupta, S. (2017). Expression signatures of HOX cluster genes in cervical cancer pathogenesis: Impact of human papillomavirus type 16 oncoprotein E7. *Oncotarget*, 8(22), 36591–36602
120. Salcedo M, Pina-Sanchez P, Vallejo-Ruiz V, et al. Genotipos del virus del papiloma humano entre mujeres en México: un estudio del instituto mexicano para la seguridad social. *Asiático Pac J Cáncer Prev*. 2014; 15: 10061-6
121. Sankaranarayanan R, & Wesley R (2005) Manual práctico para la Detección Visual de las Neoplasias Cervicales, Paris, Francia: Ed IARC Press
122. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*;307(5712):1098-1101.
123. Secretaria de salud (2015) Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino, Gobierno de México. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica> el 10 de septiembre del 2019

124. Sellors J, & Sankaranarayanan R (2003) La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical: Manual para principiantes, Washington Estados Unidos de América, Ed Organización Panamericana de la Salud
125. Sharma, S., Mandal, P., Sadhukhan, T., Roy Chowdhury, R., Ranjan Mondal, N., Chakravarty, B., Sengupta, S. (2015). Bridging Links between Long Noncoding RNA HOTAIR and HPV Oncoprotein E7 in Cervical Cancer Pathogenesis. *Scientific reports*, 5, 11724.
126. Schmitt, M., Depuydt, C., Benoy, I., Bogers, J., Antoine, J., Arbyn, M, VALGENT Study Group (2013). Multiple human papillomavirus infections with high viral loads are associated with cervical lesions but do not differentiate grades of cervical abnormalities. *Journal of clinical microbiology*, 51(5), 1458–1464.
127. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; (2001) Bethesda 2001 Workshop. *JAMA*, 287:2114-9.
128. Sun B, Hua J, Cui H, Liu H, Zhang K, Zhou H. (2019) La regulación negativa de MicroRNA-1197 inhibe la proliferación y la migración en células humanas de cáncer de pulmón de células no pequeñas mediante la regulación positiva de HOXC11. *Biomed Pharmacother*, 117: 109041-101016
129. Taejong Song, Seok Ju Seong, Seon-Kyung Lee, Byoung-Ryun Kim, Woong Ju, Ki Hyung Kim, Kyehyun Nam, Jae Chul Sim & Tae Jin Kim (2019) Searching for an ideal cervical cancer screening model to reduce false-negative errors in a country with high prevalence of cervical cancer, *Journal of Obstetrics and Gynaecology*.
130. Teschendorff, A. E., Jones, A., Fiegler, H., Sargent, A., Zhuang, J. J., Kitchener, H. C., & Widschwendter, M. (2012). Epigenetic variability in cells of normal cytology is associated with the risk of future morphological transformation. *Genome medicine*, 4(3),
131. Tian, X., Chen, D., Zhang, R., Zhou, J., Peng, X., Yang, X., Zhang, X., & Zheng, Z. (2015). Quantitative survey of multiple CpGs from 5 genes identifies CpG methylation panel discriminating between high- and low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Clinical epigenetics*, 7(1), 4.
132. Torres J, Cruz A, Madrid V (2014) Epidemiología del cáncer Cervicouterino, *Gaceta Nacional de Oncología*, 13(4): 4.
133. Torres-Poveda K, Ruiz-Fraga I, Madrid-Marina V, Chavez M, Richardson V. High risk HPV infection prevalence and associated cofactors: a population-based study in female ISSSTE beneficiaries attending the HPV screening and early detection of cervical cancer program. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1205. Published 2019 Dec 10. doi:10.1186/s12885-019-6388-4
134. Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, deVries M, Franco EL (2011). Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies. *Prev Med (Baltim)*;53:S12–21
135. Trottier H, Mahmud S, Costa M, Duarte E, Rohan T, Ferenczy A (2006) Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia *Cancer Epidemiol Biomarkers*, (15) (7).
136. Vaccarella S, Herrero R, et al (2008) The IARC HPV Prevalence Surveys (IHPS) Study Group, Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys, *International Journal of Epidemiology*, 37(3): 536–546.
137. Vasiljević, N., Scibior-Bentkowska, D., Brentnall, A. R., Cuzick, J., & Lorincz, A. T. (2014). Credentialing of DNA methylation assays for human genes as diagnostic biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia in high-risk HPV positive women. *Gynecologic oncology*, 132(3), 709–714.
138. Velazquez N, Jimenez L (2010) Human papillomavirus infection in women from Tlaxcala, Mexico, *Brazilian Journal of microbiology* (41) 3.
139. Velazquez N, Paredes M, Perez H, Santos G, Reyes J (2009) Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla, Mexico *International Journal of Infectious Disease*, 13(6): 690-695.
140. Wentzensen, N., Sherman, M. E., Schiffman, M., & Wang, S. S. (2009). Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. *Gynecologic oncology*, 112(2), 293–299.
141. Wentzensen, N., Schiffman, M., Palmer, T. y Arbyn, M. (2016). Triage de mujeres con VPH positivo en el cribado del cáncer cervical *Revista de virología clínica: la*

- publicación oficial de la Sociedad Panamericana de Virología Clínica*, 76 supl. 1 (supl. 1), S49 – S55
142. Wen, Y., Cai, J., Hou, Y., Huang, Z., & Wang, Z. (2017). Role of EZH2 in cancer stem cells: from biological insight to a therapeutic target. *Oncotarget*, 8(23), 37974–37990.
 143. Wijetunga, N. A., Ben-Dayana, M., Tozour, J., Burk, R. D., Schlecht, N. F., Einstein, M. H., & Grealley, J. M. (2016). A polycomb-mediated epigenetic field defect precedes invasive cervical carcinoma. *Oncotarget*, 7(38), 62133–62143.
 144. Wu S, Yi Zhang (2011) Cyclin-dependent Kinase 1 (CDK1)-mediated Phosphorylation of Enhancer of Zeste 2 (Ezh2) Regulates Its Stability, *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 28511-28519.
 145. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW (2001) alpha (6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun.* 283(3):668-73.
 146. Yunes-Díaz, E., Ruiz, P. A., & Lazcano-Ponce, E. (2015). *Assessment of the Validity and Reproducibility of the Pap Smear in Mexico: Necessity of a Paradigm Shift. Archives of Medical Research*, 46(4), 310–316.
 147. Zaldívar G, Molina F (2001) Cáncer Cervicouterino y virus del papiloma humano, *Gaceta mexicana de oncología* (10)5: 288-294.
 148. Zartuche J, Salazar M (2013) Marcadores inmunohistoquímicos para virus de papiloma humano. Revisión sistemática. *Rev. Sanid Milit Mex*; 67(5): 205-213
 149. Zhang, L., Wu, J., Ling, M. T., Zhao, L., & Zhao, K. N. (2015). The role of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in human cancers induced by infection with human papillomaviruses. *Molecular cancer*, 14, 87.
 150. Zur Hausen H, Gissmann L, Schlehofer JR. Viruses in the etiology of human genital cancer. *Prog Med Virol.* 1984;30:170-186.

15. Anexos

Anexo 1. Presencia de VPH y su relación con características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden al programa de tamizaje

	VPH AR positivo		VPH-AR Negativo		p
	n	%	n	%	
Grupo de edad					
≤24	35	34.3	67	66.7	0.00001
25-29	83	38.6	132	61.4	
30-39	122	23.4	400	76.6	
40-49	89	17.7	414	82.3	
≥50	43	13.7	272	86.3	
Total	372	22.5	1285	77.5	
IVS					
≤18	212	26.6	584	73.4	0.00001
≥19	149	18.9	638	81.1	
Total	361	22.8	1222	77.2	
Número de parejas sexuales					
1	66	14.4	392	85.6	0.00001
2	98	24.1	308	75.9	
3	81	25.3	239	74.7	
≥4	112	30.0	261	70.0	
Total	357	22.9	1200	77.1	
Número de embarazos					
0	68	30.5	155	69.5	0.014
1	67	23.0	224	77.0	
2	107	23.4	350	76.6	
3	63	18.3	281	81.7	
≥4	54	20.3	212	79.7	
Total	359	22.7	1222	77.3	
Número de partos					
0	174	23.4	570	76.6	0.672
1	64	21.8	229	78.2	
2	60	21.5	219	78.5	
3	33	19.9	133	80.1	
≥4	24	27.3	64	72.7	
Total	355	22.6	1215	77.4	
Uso de anticonceptivos					
Si	261	23.2	866	76.8	0.678
No	97	22.1	341	77.9	
Total	358	22.8	1207	77.2	
Anticonceptivo que utiliza					
Hormonal	35	24.0	111	76.0	0.259
Condón	63	28.6	157	71.4	
Salpingoclasia	88	20.3	345	79.7	
DIU	59	23.7	190	71.4	
Otro	16	22.5	55	77.5	
Total	262	23.4	859	76.6	
Alcoholismo					
Si	93	24.8	282	75.2	0.297
No	212	21.6	768	78.4	
Total	305	22.6	1050	77.4	
Tabaquismo					
Si	88	25.8	253	74.2	0.361
No	256	22.4	888	77.6	
Total	344	23.1	1142	76.9	

Anexo 2. Presencia de VPH y su relación con características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden a clínica de displasias

	VPH AR positivo n (%)		VPH-AR Negativo n %		p
Grupo de edad					0.00001
≤24	38	60.3	25	39.7	
25-29	55	50.5	54	49.5	
30-39	118	46.3	137	53.7	
40-49	70	28.9	172	71.1	
≥50	91	36.1	161	63.9	
Total	372	40.4	549	59.6	
IVS					0.959
≤18	188	39.8	282	60.2	
≥19	133	40.0	201	60.0	
Total	321	39.9	483	60.1	
Número de parejas sexuales					0.005
1	126	33.8	247	66.2	
2	82	44.3	103	55.7	
3	58	47.2	65	52.8	
≥4	49	48.0	53	52.0	
Total	315	40.2	468	59.8	
Número de embarazos					0.00001
0	54	61.4	34	48.6	
1	56	46.3	65	53.7	
2	69	35.6	125	64.4	
3	76	37.4	127	62.6	
≥4	85	35.3	156	64.7	
Total	340	40.1	507	59.9	
Número de partos					0.260
0	124	44.8	153	55.2	
1	57	42.9	76	57.1	
2	60	37.7	99	62.3	
3	51	37.5	85	62.5	
≥4	40	34.8	90	65.2	
Total	340	40.3	503	59.7	
Uso de anticonceptivos					0.098
Si	231	39.1	360	60.9	
No	92	39.8	139	60.2	
Total	323	39.5	499	60.5	
Anticonceptivo que utiliza					0.035
Hormonal	35	47.8	36	52.3	
Condón	53	47.3	59	52.9	
Salpingoclasia	82	31.4	179	68.6	
DIU	37	41.6	52	58.4	
Otro	21	42.0	29	58.0	
Total	226	38.8	355	61.2	
Alcoholismo					0.054
Si	38	48.1	41	51.9	
No	245	37.0	418	63.0	
Total	283	38.1	459	61.9	
Tabaquismo					0.047
Si	75	45.7	89	54.3	
No	237	37.3	399	62.7	
Total	312	39.0	488	61.0	

Anexo 3. Características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden al programa de tamizaje por sede.

Grupo de edad						
	General n (%)	CDMX n (%)	Puebla n (%)	Guerrero n (%)	Quintana Roo n (%)	P
≤24	102 (6.2)	62 (6.4)	17 (11.3)	8 (4.3)	15 (4.2)	0.000
25-29	215 (13.0)	84 (8.7)	22 (14.7)	12 (6.5)	97 (6.5)	
30-39	522 (31.4)	317 (32.8)	45 (30)	42 (22.6)	118 (33.1)	
40-49	503 (30.4)	307 (31.8)	43 (28.7)	67 (36.0)	86 (24.2)	
≥50	315 (19.0)	195 (20.2)	23 (15.3)	57 (30.6)	40 (11.2)	
Total	1657 (100)	965 (100)	150 (100)	186 (100)	356 (100)	
IVS						
≤18	796 (50.3)	416 (46.1)	82 (55)	76 (42.5)	222 (62.9)	0.000
≥19	787 (49.7)	486 (53.9)	67 (45)	103 (57.5)	131 (37.1)	
Total	1583 (100)	902 (100)	149 (100)	179 (100)	353 (100)	
Número de parejas sexuales						
1	458 (29.3)	218 (24.4)	48 (32.0)	95 (57.9)	97 (27.8)	0.000
2	406 (26.1)	230 (25.7)	47 (31.3)	37 (22.6)	92 (26.4)	
3	320 (20.6)	197 (22.0)	23 (15.3)	21 (12.8)	79 (22.6)	
≥4	373 (24.0)	249 (27.9)	32 (21.4)	11 (6.7)	81 (23.7)	
Total	1557 (100)	894 (100)	150 (100)	164 (100)	349 (100)	
Número de embarazos						
0	223 (14.1)	155 (17.3)	17 (11.3)	12 (6.6)	39 (11.1)	0.000
1	291 (18.4)	191 (21.3)	30 (20.0)	21 (11.6)	49 (13.8)	
2	457 (28.9)	257 (28.7)	41 (27.3)	56 (31.0)	103 (29.1)	
3	344 (21.8)	176 (19.6)	30 (20.0)	54 (29.8)	84 (23.7)	
≥4	267 (16.8)	117 (13.1)	32 (21.4)	38 (21.0)	79 (22.3)	
Total	1581 (100)	896 (100)	150 (100)	181 (100)	354 (100)	
Número de partos						
0	744 (47.1)	488 (54.8)	71 (47.3)	65 (36.9)	120 (33.9)	0.000
1	293 (18.7)	161 (18.1)	27 (18)	38 (21.6)	67 (18.9)	
2	279 (17.8)	151 (17.0)	27 (18)	32 (18.2)	69 (19.5)	
3	166 (10.6)	67 (7.5)	15 (10)	29 (16.5)	55 (15.5)	
≥4	88 (5.6)	23 (2.6)	10 (6.7)	12 (6.8)	43 (12.2)	
Total	1570 (100)	890 (100)	150 (100)	176 (100)	354 (100)	
Uso de anticonceptivos						
Si	1127(71.9)	654 (73.6)	112 (74.7)	134 (76.6)	227 (64.6)	0.003
No	438 (28.1)	235 (26.4)	38 (25.3)	41 (23.4)	124 (35.4)	
Total	1567 (100)	889 (100)	150 (100)	175 (100)	351 (100)	
Anticonceptivo que utiliza						
Hormonal	(13.0)	98 (15.2)	8 (7.1)	11 (8.5)	29 (12.8)	0.006
Condón	220 (19.6)	155 (23.9)	25 (22.1)	15 (11.5)	25 (11.0)	
OTB	433 (38.7)	198 (30.5)	48 (42.5)	65 (50)	122 (53.7)	
DIU	249 (22.3)	150 (23.0)	23 (20.4)	35 (26.9)	41 (18.1)	
Otro	71 (6.4)	48 (7.4)	9 (8.0)	4 (3.1)	10 (4.4)	
Total	1121 (100)	649 (100)	113 (100)	130 (100)	227 (100)	
Alcoholismo						
Si	375 (27.7)	276 (35.2)	22 (15.8)	13 (8.1)	64 (23.8)	0.000
No	980 (72.3)	507 (64.8)	117 (84.2)	148 (91.9)	208 (76.2)	
Total	1355 (100)	783 (100)	139 (100)	161 (100)	272 (100)	
Tabaquismo						
Si	341 (22.9)	215 (25.6)	41 (27.5)	17 (10.6)	68 (20.1)	0.001
No	1144 (77.1)	624 (74.4)	108 (72.5)	143 (89.4)	269 (79.9)	
Total	1486 (100)	839 (100)	149 (100)	160 (100)	337 (100)	

Anexo 4 Presencia de VPH y su relación con características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden al programa de tamizaje.

Resultado VPH-AR		General n (%)	CDMX n (%)	Puebla n (%)	Guerrero n (%)	Quintana Roo n (%)	p
Grupo de edad de las pacientes							
VPH-AR +	≤24	35 (34.3)	21 (33.9)	4 (23.5)	4 (50.0)	6 (40.0)	0.578
VPH-AR -	≤24	67 (66.7)	41 (66.1)	13 (76.5)	4 (50.0)	9 (60.0)	
VPH-AR +	25-29	83 (38.6)	22 (26.2)	7 (31.8)	5 (41.7)	49 (50.5)	0.008
VPH-AR -	25-29	132 (61.4)	62 (73.8)	15 (68.2)	7 (58.7)	48 (49.5)	
VPH-AR +	30-39	122 (23.4)	71 (22.4)	5 (11.1)	3 (7.1)	43 (36.4)	0.00008
VPH-AR -	30-39	400 (76.6)	246 (77.6)	40 (88.9)	39 (92.9)	75 (63.6)	
VPH-AR +	40-49	89 (17.7)	41 (13.4)	7 (16.3)	11 (16.4)	30 (34.9)	0.00008
VPH-AR -	40-49	414 (82.3)	266 (86.6)	36 (83.7)	56 (83.6)	56 (65.1)	
VPH-AR +	≥50	43 (13.7)	26 (13.3)	2 (8.7)	6 (10.5)	9 (22.5)	0.305
VPH-AR -	≥50	272 (86.3)	169 (86.7)	21 (91.3)	51 (89.5)	31 (77.5)	
VPH-AR +	Total	372 (22.5)	181 (18.8)	25 (16.7)	29 (15.6)	137 (38.5)	0.0001
VPH-AR -	Total	1285 (77.5)	784 (81.2)	125(83.3)	157(84.4)	219 (61.5)	
	p	0.00001	0.00001	0.180	0.002	0.027	
Edad de inicio de la vida sexual							
VPH-AR +	≤18	212 (26.6)	99 (23.8)	11 (13.4)	13 (17.1)	89 (40.1)	0.0001
VPH-AR -	≤18	584 (73.4)	317 (76.2)	71 (86.6)	63 (82.9)	133 (59.9)	
VPH-AR +	≥19	149 (18.9)	74 (15.8)	14 (20.9)	15 (14.6)	46 (35.1)	0.0001
VPH-AR -	≥19	638 (81.1)	412 (84.8)	53 (79.1)	88 (85.4)	85 (64.9)	
VPH-AR +	Total	361 (22.8)	173 (19.2)	25 (16.8)	28 (15.6)	135 (48.2)	0.0001
VPH-AR -	Total	1222 (77.2)	729 (80.8)	124(83.2)	151(84.4)	218 (61.8)	
	p	0.00001	0.001	0.224	0.644	0.353	
Número de parejas sexuales de las paciente							
VPH-AR +	1	66 (14.4)	22 (10.1)	7 (14.6)	9 (9.5)	28 (28.9)	0.0001
VPH-AR -	1	392 (85.6)	196 (89.9)	41 (85.4)	86 (90.5)	69 (71.1)	
VPH-AR +	2	98 (24.1)	45 (19.6)	7 (14.6)	4 (10.8)	42 (45.7)	0.0001
VPH-AR -	2	308 (75.9)	185 (80.4)	40 (85.1)	33 (89.2)	50 (54.3)	
VPH-AR +	3	81 (25.3)	37 (18.8)	4 (17.4)	9 (42.9)	31 (39.2)	0.001
VPH-AR -	3	239 (74.7)	160 (81.2)	19 (82.6)	12 (57.1)	48 (60.8)	
VPH-AR +	≥4	112 (30.0)	68 (27.3)	7 (21.9)	4 (36.4)	33 (40.7)	0.089
VPH-AR -	≥4	261 (70.0)	181 (72.7)	25 (78.1)	7 (63.6)	48 (59.3)	
VPH-AR +	Total	357 (22.9)	172 (19.2)	25 (16.7)	26 (15.9)	134 (38.4)	0.0001
VPH-AR -	Total	1200 (77.1)	722 (80.8)	125(83.3)	138 (100)	215(61.6)	
	p	0.00001	0.00001	0.828	0.00001	0.112	
Número de embarazos							
VPH-AR +	0	68 (30.5)	38 (24.5)	8 (47.1)	4 (33.3)	18 (46.2)	0.025
VPH-AR -	0	155 (69.5)	117 (75.5)	9 (52.9)	8 (66.7)	21 (53.8)	
VPH-AR +	1	67 (23.0)	39 (20.4)	2 (6.7)	4 (19.0)	22 (44.9)	0.0001
VPH-AR -	1	224 (77.0)	152 (79.6)	28 (93.3)	17 (81.0)	27 (55.1)	
VPH-AR +	2	107 (23.4)	52 (20.2)	10 (24.4)	4 (7.1)	41 (39.8)	0.0001
VPH-AR -	2	350 (76.6)	205 (79.8)	31 (75.6)	52 (92.9)	62 (60.2)	
VPH-AR +	3	63 (18.3)	26 (14.8)	2 (6.7)	7 (13.0)	28 (33.3)	0.0001
VPH-AR -	3	281 (81.7)	150 (85.2)	28 (93.3)	47 (87.0)	56 (66.7)	
VPH-AR +	≥4	54 (20.3)	16 (13.7)	3 (9.4)	9 (23.7)	26 (32.9)	0.004
VPH-AR -	≥4	212 (79.7)	101 (86.3)	29 (90.6)	29 (76.3)	53 (67.1)	
VPH-AR +	Total	359 (22.7)	171(19.1)	25(16.7)	28 (15.5)	135 (38.1)	0.0001
VPH-AR -	Total	1222 (77.3)	725 (80.9)	125(83.3)	153 (84.5)	219 (61.9)	
	p	0.014	0.102	0.001	0.080	0.424	

Número de partos							
VPH-AR +	0	174 (23.4)	96 (19.7)	16 (22.5)	12 (18.5)	50 (41.7)	0.0001
VPH-AR -	0	570 (76.6)	392 (80.3)	55 (77.5)	53 (81.5)	70 (58.3)	
VPH-AR +	1	64 (21.8)	35 (21.7)	3 (11.1)	4 (10.5)	22 (32.8)	0.024
VPH-AR -	1	229 (78.2)	126 (78.3)	24 (88.9)	34 (89.5)	45 (67.2)	
VPH-AR +	2	60 (21.5)	25 (16.6)	3 (11.1)	3 (9.4)	29 (42.0)	0.0001
VPH-AR -	2	219 (78.5)	126 (83.4)	24 (88.9)	29 (90.6)	40 (58.0)	
VPH-AR +	3	33 (19.9)	8 (11.9)	2 (13.3)	4 (13.8)	19 (34.5)	0.011
VPH-AR -	3	133 (80.1)	59 (88.1)	13 (86.7)	25 (86.2)	36 (65.5)	
VPH-AR +	≥4	24 (27.3)	4 (17.4)	1 (10)	4 (33.3)	15 (34.9)	0.249
VPH-AR -	≥4	64 (72.7)	19 (82.6)	9 (90.0)	8 (66.7)	28 (65.1)	
VPH-AR +	Total	355 (22.6)	168(18.9)	25 (16.7)	27 (15.3)	135 (38.1)	0.0001
VPH-AR -	Total	1215 (77.4)	722 (81.1)	125(83.3)	149 (84.7)	219(61.9)	
	p	0.672	0.443	0.493	0.278	0.668	
Uso de anticonceptivos							
VPH-AR +	Si	261 (23.2)	138 (21.1)	17 (78.9)	20 (14.9)	86 (37.9)	0.0001
VPH-AR -	Si	866 (76.8)	516 (78.9)	95 (84.8)	114 (85.1)	141 (62.1)	
VPH-AR +	No	97 (22.1)	34 (14.5)	8 (21.1)	7 (17.1)	48 (38.7)	0.0001
VPH-AR -	No	341 (77.9)	201 (85.5)	30 (78.9)	34 (82.9)	76 (61.3)	
VPH-AR +	Total	358 (22.8)	172 (19.3)	25 (16.7)	27 (15.4)	134 (38.0)	0.0001
VPH-AR -	Total	1207 (77.2)	717 (80.7)	125(83.3)	148 (84.6)	217 (62)	
	p	0.678	0.027	0.401	0.739	0.534	
Anticonceptivo que utilizan las pacientes							
VPH-AR +	Hormonal	35 (24.0)	21 (21.4)	0 (0)	3 (27.3)	11 (37.9)	0.110
VPH-AR -	Hormonal	111 (76.0)	77 (78.6)	8 (100)	8 (72.7)	18 (62.1)	
VPH-AR +	DIU	59 (23.7)	32 (21.3)	5 (21.7)	3 (8.6)	19 (46.3)	0.001
VPH-AR -	DIU	190 (76.3)	118 (78.7)	18 (78.3)	32 (91.4)	22 (53.7)	
VPH-AR +	Condón	63 (28.6)	41 (26.5)	5 (20.0)	3 (20.0)	14 (56.0)	0.012
VPH-AR -	Condón	157 (71.4)	114 (73.5)	20 (80.0)	12 (80.0)	11 (44.0)	
VPH-AR +	OTB	88 (20.3)	33 (16.7)	6 (15.5)	10 (15.4)	39 (32.0)	0.002
VPH-AR -	OTB	345 (79.7)	165 (83.3)	42 (87.5)	55 (84.6)	83 (68.0)	
VPH-AR +	Otro	16 (22.5)	10 (20.8)	1 (11.1)	1 (25.0)	4 (40.0)	0.473
VPH-AR -	Otro	55 (77.5)	38 (79.2)	8 (88.9)	3 (75.0)	6 (60.0)	
VPH-AR +	Total	262 (23.4)	137 (21.2)	17(15.0)	20 (15.4)	87 (38.3)	0.0001
VPH-AR -	Total	859 (76.6)	512 (78.8)	96 (85.0)	110 (84.6)	140 (61.7)	
	p	0.259	0.307	0.549	0.563	0.164	
Alcoholismo							
VPH-AR +	Si	93 (24.8)	56 (20.3)	5 (22.7)	1 (7.7)	31 (48.4)	0.0001
VPH-AR -	Si	282 (75.2)	220 (79.7)	17 (77.3)	12 (92.3)	33 (51.6)	
VPH-AR +	No	212 (21.6)	98 (19.3)	18 (15.4)	23 (15.5)	73 (35.1)	0.0001
VPH-AR -	No	768 (78.4)	409 (80.7)	99 (84.6)	125 (84.5)	135 (64.9)	
VPH-AR +	Total	305 (22.6)	154 (19.7)	23 (16.5)	24 (14.9)	104 (38.3)	0.0001
VPH-AR -	Total	1050 (77.4)	629 (80.3)	116(83.5)	137 (85.1)	168 (61.7)	
	p	0.297	0.747	0.395	0.446	0.158	
Tabaquismo							
VPH-AR +	Si	88 (25.8)	44 (20.5)	8 (19.5)	4 (23.5)	32 (47.1)	0.0001
VPH-AR -	Si	253 (74.2)	171 (79.5)	33 (80.5)	13 (76.5)	36 (52.9)	
VPH-AR +	No	256 (22.4)	123 (19.7)	17 (15.7)	22 (15.4)	94 (34.9)	0.0001
VPH-AR -	No	888 (77.6)	501 (80.3)	91 (84.3)	121 (84.6)	175 (65.1)	
VPH-AR +	Total	344 (23.1)	167 (19.9)	25 (16.8)	26 (16.3)	126 (37.3)	0.0001
VPH-AR -	Total	1142 (76.9)	672 (80.1)	124(83.2)	134 (83.8)	211 (62.7)	
	p	0.361	0.811	0.582	0.389	0.135	

Anexo 5. Características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden a clínica de displasias por sede.

	General n (%)	CDMX n (%)	Puebla n (%)	Guerrero n (%)	Yucatán n (%)	Quintana Roo n (%)	P
Grupo de edad							
≤24	63 (6.8)	13 (4.3)	3 (4.8)	7 (3.6)	27 (11.8)	13 (9.8)	0.032
25-29	109 (11.8)	37 (12.2)	8 (12.9)	26 (13)	23 (10)	15 (11.5)	
30-39	255 (27.7)	95 (31.3)	11 (17.8)	56 (29.2)	59(25.8)	34 (25.7)	
40-49	242 (26.3)	71 (23.4)	24 (38.7)	51 (26.1)	57(24.9)	39 (29.5)	
≥50	252 (27.4)	88 (28.8)	16 (25.8)	54 (28.1)	63(27.5)	31 (23.5)	
Total	921 (100)	304 (100)	62 (100)	192 (100)	229(100)	132 (100)	
Edad de inicio de la vida sexual							
≤18	470 (58.5)	143 (62.7)	29 (50)	95 (51.6)	132 (57.6)	71 (67.6)	0.031
≥19	334 (41.5)	85 (37.3)	29 (50)	89 (48.4)	97 (42.4)	34 (32.4)	
Total	804 (100)	228 (100)	58 (100)	184 (100)	229 (100)	105 (100)	
Número de parejas sexuales							
1	373 (47.6)	58 (26.3)	34 (58.6)	105 (59.7)	142 (62.6)	34 (33.6)	0.000
2	185 (23.7)	62 (28)	12(20.7)	37 (21)	45 (19.8)	29 (28.7)	
3	123 (15.7)	42 (19)	8 (13.8)	23 (13.1)	25 (11)	25 (24.8)	
≥4	102 (13)	59 (26.7)	4 (6.9)	11 (6.2)	15 (6.6)	13 (12.9)	
Total	783 (100)	221(100)	58 (100)	176 (100)	227 (100)	101 (100)	
Número de embarazos							
0	88 (10.4)	30 (11.6)	5 (8.8)	16 (8.5)	29 (12.8)	8 (6.8)	0.104
1	121 (14.3)	46 (17.8)	4 (7)	28 (15)	25 (11)	18 (15.4)	
2	194 (22.9)	67 (25.9)	12 (21)	45 (24.1)	52 (22.9)	18 (15.4)	
3	203 (24)	57 (22)	16 (28.1)	43 (23)	59 (26)	28 (23.9)	
≥4	241 (28.4)	59 (22.7)	20 (35.1)	55 (29.4)	62 (27.3)	45 (38.5)	
Total	847 (100)	259(100)	57 (100)	187(100)	227(100)	117(100)	
Número de partos							
0	277(32.9)	84 (33.1)	25 (43.9)	65 (34.9)	76 (33.5)	27 (23.1)	0.004
1	133 (15.8)	53 (20.9)	3 (5.3)	31 (16.7)	26 (11.4)	20 (17.1)	
2	159 (18.9)	50 (19.7)	7 (12.2)	27 (14.5)	54 (23.8)	21 (17.9)	
3	136 (16.1)	43 (16.9)	9 (15.8)	30 (16.1)	30 (13.2)	24 (20.5)	
≥4	138 (16.3)	26 (9.4)	13 (22.8)	33 (17.8)	41 (18.1)	25 (31.4)	
Total	843(100)	256(100)	57 (100)	186(100)	227(100)	117(100)	
Uso de anticonceptivos							
Si	591 (71.6)	156 (69.6)	48 (77.4)	144 (77.8)	153 (66.8)	90 (73.8)	0.045
No	231 (28.4)	68 (30.4)	14 (22.6)	41 (22.2)	76 (33.2)	32 (26.2)	
Total	822 (100)	224 (100)	61 (100)	185 (100)	229 (100)	122 (100)	
Anticonceptivo que utiliza							
Hormonal	69 (11.9)	23 (14.7)	3 (6.4)	16 (11.2)	17 (11.3)	10 (11.8)	0.000
Condón	112 (19.3)	49 (31.4)	5 (10.6)	20 (14.0)	24 (16)	14 (16.5)	
OTB	261(44.9)	44 (28.2)	33 (70.2)	81 (56.6)	93 (62)	10 (11.8)	
DIU	89 (15.3)	29 (18.6)	6 (12.8)	25 (17.5)	15	14 (16.5)	
Otro	50 (8.6)	11 (7.1)	0 (0)	1 (0.7)	1 (10.7)	37 (43.4)	
Total	581 (100)	156 (100)	47 (100)	143(100)	150(100)	85(100)	
Alcoholismo							
Si	79 (10.6)	38 (23.3)	5 (8.8)	5 (8.8)	17 (7.4)	14 (11.4)	0.000
No	663 (89.4)	125 (76.7)	52 (91.2)	166 (91.2)	212 (92.6)	108 (88.6)	
Total	742 (100)	163 (100)	57 (100)	171 (100)	229 (100)	122 (100)	
Tabaquismo							
Si	164 (20.5)	84 (39.8)	7 (12.3)	18 (9.9)	44 (19.2)	11 (9)	0.000
No	636 (79.5)	127 (60.2)	50 (87.7)	163 (90.1)	185 (80.8)	111 (91)	
Total	800 (100)	211 (100)	57 (100)	181 (100)	229 (100)	122(100)	

Anexo 6. Presencia de VPH y su relación con características clínicas y sociodemográficas de las pacientes que acuden a clínica de displasias

VPH-AR		General n (%)	CDMX n %	Puebla n (%)	Guerrero n (%)	Yucatán n (%)	Quintana Roo n (%)	p
Grupo de edad de las pacientes								
+	≤24	38 (60.3)	9 (69.2)	2 (66.7)	5 (71.4)	17(63.0)	5 (38.5)	0.475
-	≤24	25 (39.7)	4 (30.8)	1 (33.3)	2 (28.6)	10 (37.0)	8 (61.5)	
+	25-29	55 (50.5)	27 (73.0)	4 (50.0)	11 (42.3)	6 (26.1)	7 (46.7)	0.008
-	25-29	54 (49.5)	10 (27.0)	4 (50.0)	15 (57.7)	17 (73.9)	8 (53.3)	
+	30-39	118 (46.3)	52 (54.7)	3 (27.3)	23 (41.1)	25 (42.4)	15 (44.1)	0.252
-	30-39	137 (53.7)	43 (45.3)	8 (72.7)	33 (58.9)	34 (57.6)	19 (55.9)	
+	40-49	70 (28.9)	21 (29.6)	4 (16.7)	10 (19.6)	24 (42.1)	11 (28.2)	0.068
-	40-49	172 (71.1)	50 (70.4)	20 (83.3)	41 (80.4)	33 (57.9)	28 (71.8)	
+	≥50	91 (36.1)	37 (42.0)	3 (18.8)	14 (25.9)	28 (44.4)	9 (29.0)	0.077
-	≥50	161 (63.9)	51 (58.0)	13 (81.3)	40 (74.1)	35 (55.6)	22 (71.0)	
+	Total	372 (40.4)	146 (48)	16 (25.8)	63 (32.5)	100(43.7)	47 (35.6)	0.001
-	Total	549 (59.6)	158 (52.0)	46 (74.2)	131(67.5)	129(56.3)	85 (64.4)	
		0.00001	0.00001	0.162	0.012	0.131	0.488	
Edad de inicio de la vida sexual								
+	≤18	188 (39.8)	64 (44.8)	7 (24.1)	32 (33.7)	55 (41.7)	30 (42.3)	0.180
-	≤18	282 (60.2)	79 (55.2)	22 (75.9)	63 (66.3)	77 (58.3)	41 (57.7)	
+	≥19	133 (40.0)	42 (49.4)	5 (17.2)	28 (31.5)	45 (46.4)	13 (38.2)	0.008
-	≥19	201 (60.0)	43 (50.6)	24 (82.8)	61 (68.5)	52 (53.6)	21 (61.8)	
+	Total	321 (39.9)	106 (46.5)	12 (20.7)	60 (32.6)	100(43.7)	43 (41.0)	0.001
-	Total	483 (60.1)	(53.5)	46 (79.3)	124(67.4)	129(56.3)	62 (59.0)	
		0.959	0.495	0.517	0.748	0.476	0.695	
Número de parejas sexuales								
+	1	126 (33.8)	21 (36.2)	3 (8.8)	31 (29.5)	60 (42.3)	11 (32.4)	0.005
-	1	247 (66.2)	37 (63.8)	31 (91.2)	74 (70.5)	82 (57.7)	23 (67.6)	
+	2	82 (44.3)	33 (53.2)	0 (0.0)	14 (37.8)	21 (46.7)	14 (48.3)	0.014
-	2	103 (55.7)	29 (46.8)	12 (100)	23 (62.2)	24 (53.3)	15 (51.7)	
+	3	58 (47.2)	22 (52.4)	5 (62.5)	7 (30.4)	11 (44.0)	13 (52.0)	0.388
-	3	65 (52.8)	20 (47.6)	3 (37.5)	16 (69.6)	14 (56.0)	12 (48.0)	
+	≥4	49 (48.0)	27 (45.8)	4 (100)	6 (54.5)	8 (53.3)	4 (30.8)	0.174
-	≥4	53 (52.0)	32 (54.3)	0 (0.0)	5 (45.5)	7 (46.7)	9 (69.2)	
+	Total	315 (40.2)	103 (46.6)	12 (20.7)	58 (33.0)	100(44.1)	42 (41.6)	0.001
-	Total	468 (59.8)	118 (53.4)	46 (79.3)	118(67.0)	127(55.9)	59 (58.4)	
		0.005	0.241	0.00001	0.341	0.841	0.325	
Número de embarazos								
+	0	54 (61.4)	21 (70.0)	1 (20.0)	10 (62.5)	16 (55.2)	6 (75.0)	0.226
-	0	34 (48.6)	9 (30.0)	4 (80.0)	6 (37.5)	13 (44.8)	2 (25.0)	
+	1	56 (46.3)	21 (45.7)	2 (50.0)	15 (53.6)	10 (40.0)	8 (44.4)	0.902
-	1	65 (53.7)	25 (54.3)	2 (50.0)	13 (46.4)	15 (60.0)	10 (55.6)	
+	2	69 (35.6)	26 (38.8)	4 (33.3)	11 (24.4)	20 (38.5)	8 (44.4)	0.467
-	2	125 (64.4)	41 (61.2)	8 (66.7)	34 (75.6)	32 (61.5)	10 (55.6)	
+	3	76 (37.4)	29 (50.9)	3 (18.8)	10 (23.3)	24 (40.7)	10 (35.7)	0.029
-	3	127 (62.6)	28 (49.1)	13 (81.3)	33 (76.7)	35 (59.3)	18 (64.3)	
+	≥4	85 (35.3)	25 (42.4)	2 (10.0)	13 (23.6)	30 (48.4)	15 (33.3)	0.005
-	≥4	156 (64.7)	34 (57.6)	18 (90.0)	42 (76.4)	32 (51.6)	30 (66.7)	
+	Total	340 (40.1)	122 (47.1)	12 (21.1)	59 (31.6)	100(44.1)	47 (40.2)	0.001
-	Total	507 (59.9)	137(52.9)	45 (78.9)	128(68.4)	127(55.9)	70 (59.8)	
		0.00001	0.060	0.327	0.002	0.553	0.247	

Número de partos								
+	0	124 (44.8)	43 (51.2)	5 (20.0)	27 (41.5)	34 (44.7)	15 (55.6)	0.057
-	0	153 (55.2)	41 (48.8)	20 (80.0)	38 (58.5)	42 (55.3)	12 (44.4)	
+	1	57 (42.9)	27 (50.9)	2 (66.7)	10 (32.3)	11 (42.3)	7 (35.0)	0.401
-	1	76 (57.1)	26 (49.1)	1 (33.3)	21 (67.7)	15 (57.7)	13 (65.0)	
+	2	60 (37.7)	23 (46.0)	1 (14.3)	7 (25.9)	22 (40.7)	7 (33.3)	0.280
-	2	99 (62.3)	27 (54.0)	6 (85.7)	20 (74.1)	32 (59.3)	14 (66.7)	
+	3	51 (37.5)	21 (48.8)	3 (33.3)	6 (20.0)	13 (43.3)	8 (33.3)	0.138
-	3	85 (62.5)	22 (51.2)	6 (66.7)	24 (80.0)	17 (56.7)	16 (66.7)	
+	≥4	40 (34.8)	8 (30.8)	1 (7.7)	9 (27.3)	20 (48.8)	10 (40.0)	0.060
-	≥4	90 (65.2)	18 (69.2)	12 (92.3)	24 (72.7)	21 (51.2)	15 (60.0)	
+	Total	340 (40.3)	122 (47.7)	12 (21.1)	59 (31.7)	100(44.1)	47 (40.2)	0.001
-	Total	503 (59.7)	134 (52.3)	45 (78.9)	127 (68.3)	127(55.9)	70(59.8)	
		0.260	0.448	0.186	0.238	0.956	0.440	
Uso de anticonceptivos								
+	Si	231 (39.1)	71 (45.5)	14 (29.2)	43 (29.9)	67 (43.8)	36 (40.0)	0.023
-	Si	360 (60.9)	85 (54.5)	34 (70.8)	101 (70.1)	86 (56.2)	54 (60.0)	
+	No	92 (39.8)	28 (41.2)	2 (14.3)	18 (43.9)	33 (43.4)	11 (34.4)	0.292
-	No	139 (60.2)	40 (58.8)	12 (85.7)	23 (56.1)	43 (56.6)	21 (65.6)	
+	Total	323 (39.5)	99 (44.9)	16 (25.8)	61 (33.0)	100(43.7)	47 (38.5)	0.013
-	Total	499 (60.5)	125 (55.1)	46 (74.2)	124(67.0)	129(56.3)	75 (61.5)	
		0.098	0.130	0.263	0.092	0.958	0.574	
Anticonceptivo que utilizan las pacientes								
+	Hormonal	33 (47.8)	14 (60.9)	0 (0)	8 (50.0)	7 (41.2)	4 (40.0)	0.298
-	Hormonal	36 (52.3)	9 (39.1)	3 (100)	8 (50.0)	10 (55.8)	6 (60.0)	
+	Condón	53 (47.3)	25 (51.0)	4 (80.0)	7 (35.0)	12 (50.0)	5 (35.7)	0.709
-	Condón	59 (52.9)	24 (49.0)	1 (20.0)	13 (65.0)	12 (50.0)	9 (64.3)	
+	OTB	82 (31.4)	15 (34.1)	8 (24.2)	18 (22.2)	38 (40.9)	3 (30.0)	0.093
-	OTB	179 (68.6)	29 (65.9)	25 (75.8)	63 (77.8)	55 (59.1)	7 (70.0)	
+	DIU	37 (41.6)	13 (44.8)	2 (33.3)	10 (40.0)	8 (53.3)	4 (28.6)	0.709
-	DIU	52 (58.4)	16 (55.2)	4 (66.7)	15 (60.0)	7 (46.7)	10 (71.4)	
+	Otro	21 (42.0)	4 (36.4)	0 (0)	0 (0.0)	1 (100)	16 (43.2)	0.518
-	Otro	29 (58.0)	7 (63.6)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	21(56.8)	
+	Total	226 (39.3)	71 (45.5)	14 (29.8)	43(30.1)	66 (44.0)	32 (37.6)	0.025
-	Total	355 (60.7)	85 (54.5)	33 (70.2)	100(69.9)	84 (56.0)	53 (62.4)	
		0.049	0.242	0.050	0.124	0.763	0.865	
Alcoholismo								
+	Si	38 (48.1)	21 (55.3)	10 (19.2)	0 (0.0)	9 (52.9)	7 (50.0)	0.127
-	Si	41 (51.9)	17 (44.7)	4 (80.0)	5 (100)	8 (47.1)	7 (50.0)	
+	No	245 (37.0)	53 (42.4)	1 (20.0)	51 (30.7)	91 (42.9)	40 (37.0)	0.006
-	No	418 (63.0)	72 (57.6)	42 (80.8)	115 (69.3)	121(57.1)	68 (63.0)	
+	Total	283 (38.1)	74 (45.4)	11 (19.3)	51 (29.8)	100(43.7)	47 (38.5)	0.001
-	Total	459 (61.9)	89 (54.6)	46 (80.7)	120 (70.2)	129(56.3)	75 (61.5)	
		0.054	0.163	0.967	0.139	0.423	0.348	
Tabaquismo								
+	Si	75 (45.7)	41 (48.8)	9 (18.0)	7 (38.9)	18 (40.9)	7 (14.9)	0.505
-	Si	89 (54.3)	43 (51.2)	5 (71.4)	11 (61.1)	26 (59.1)	4 (5.3)	
+	No	237 (37.3)	55 (43.3)	2 (28.6)	51 (31.3)	82 (44.3)	40 (85.1)	0.002
-	No	399 (62.7)	72 (56.7)	41 (82.0)	112 (68.7)	103(55.7)	71 (94.7)	
+	Total	312 (39.0)	96 (45.5)	11 (19.3)	58 (32.0)	100(43.7)	47 (100)	0.001
-	Total	488 (61.0)	115(54.5)	46 (80.7)	123 (68.0)	129(56.3)	75 (100)	
		0.047	0.432	0.507	0.512	0.681	0.073	