



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Análisis de la relación entre el Virus del Papiloma Humano,
el microbioma y la respuesta inflamatoria en moco cérvico-
vaginal de mujeres con eversión glandular.

T E S I S

Que para obtener el título de:

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A:

Mariana López Filloy

Facultad de Medicina



Directora de tesis:

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2021



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.

Agradecimientos académicos

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta perteneciente al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El presente proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Clave IN204419).

Agradezco a mi tutora, la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, por recibirme en su laboratorio desde mi tercera rotación, por su dedicación en mi formación y por el apoyo en la realización de este proyecto.

Agradezco a mi jurado conformado por el Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, la Dra. Yolanda López Vidal, el Dr. Luis Padilla Noriega y la Dra. Paula Licon Limón por las observaciones y aportaciones que le hicieron a este trabajo.

Agradezco a la M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IIB, por el apoyo técnico brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco a la Fundación Cruz-Talonia por brindarme las muestras con las que se realizó este trabajo.

Agradezco a la M. en C. María del Pilar Ramos Godínez; Laboratorio de microscopía del INCAN por el apoyo en la realización de la microscopía electrónica de transmisión.

Agradezco a la M. en C. Guadalupe Gómez García; Laboratorio de usos múltiples de la FES Zaragoza, por el apoyo técnico brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco a la Dra. Sandra Pinto Cardoso y la M. en C. Montserrat Chávez Torres; Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, por el apoyo experimental y en el análisis de los datos de secuenciación del microbioma.

Agradezco al Dr. Ismael Mancilla Herrera; Instituto de Perinatología y al M. en C. Víctor Adrián Cortés Morales; Hospital de oncología del CMN-SXXI por su apoyo en la realización de los ensayos de citometría de flujo.

Índice

Abreviaturas	I
Lista de figuras.....	II
Lista de tablas	II
Resumen	III
Abstract.....	IV
1. Introducción.....	1
1.1 Cérvix.....	1
Anatomía.....	1
Histología	2
Eversión glandular.....	5
1.2 Cáncer Cervicouterino.....	6
Tipos de cáncer cervicouterino.....	7
Epidemiología.....	7
Factores de riesgo.....	9
1.3 Virus del Papiloma Humano	9
Ciclo de vida y transformación.....	11
1.4 VPH y respuesta inflamatoria	14
1.5 Microbiota vaginal y VPH	17
2. Antecedentes.....	21
2.1 Eversión glandular y VPH.....	21
2.2 VPH, microbiota e inflamación.....	22
3. Planteamiento del problema.....	25
4. Hipótesis	26
5. Objetivos	26
6. Materiales y métodos.....	27
6.1 Obtención de muestras	27
6.2 Detección del VPH en moco cérvico-vaginal	29
6.3 Evaluación de microbiota presente en moco cérvico-vaginal.....	32
6.4 Cuantificación de citocinas en moco cérvico-vaginal	34
6.5 Análisis estadístico	35
7. Resultados	37
7.1 Población de estudio	37
7.2 Detección del VPH en moco cérvico-vaginal	38

PCR	38
ELISA	40
Microscopía electrónica	41
7.3 Evaluación de la microbiota	43
Diversidad bacteriana	43
Perfil taxonómico	45
7.4 Cuantificación de citocinas y quimiocinas en moco cérvico-vaginal	48
ELISA	49
Citometría de flujo	50
7.5 Asociaciones entre VPH, microbiota vaginal e inflamación	51
8. Discusión	55
8.1 Población de estudio	55
8.2 Detección del VPH en moco cérvico-vaginal	55
8.3 Asociaciones entre VPH, microbiota vaginal e inflamación	58
9. Conclusiones	64
10. Perspectivas	64
11. Referencias	65
12. Anexos	78

Abreviaturas

ANOVA	Del inglés: Analysis of variance
ASV	Del inglés: Amplicon sequence variant
AV	Del inglés: Aerobic vaginitis
BV	Del inglés: Bacterial vaginosis
CBA	Del inglés: Cytometric bead array
CaCU	Cáncer cervicouterino
CST	Del inglés: Community state type
DAMPs	Del inglés: Damage-associated molecular patterns
ELISA	Del inglés: Enzyme-Linked immunosorbent assay
HS	Heparán sulfato
HSIL	Del inglés: High grade squamous intraepithelial lesion
HSPG	Del inglés: Heparan Sulfate Proteoglycan
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ITS	Infección de transmisión sexual
IVSA	Inicio de vida sexual activa
LEfSe	Del inglés: Linear discriminant analysis effect size
LSIL	Del inglés: Low grade squamous intraepithelial lesion
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Del inglés: Natural killer cell
NLRs	Del inglés: NOD-like receptors
MCV	Moco cérvico-vaginal
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopía electrónica de transmisión
PAMPs	Del inglés: Pathogen-associated molecular patterns
PCoA	Del inglés: Principal component analysis
PCR	Del inglés: Polymerase chain reaction
PRRs	Del inglés: Pattern recognition receptors
SEM	Del inglés: Standard error of the mean
T_{FH}	Del inglés: T follicular helper cell
T_H	Del inglés: T helper cell
TLR	Del inglés: Toll-like Receptors
TNF	Del inglés: Tumor necrosis factor
TS-MPG	Del inglés: Type-specific multiplex genotyping assay
UEC	Unión escamocolumnar
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma Humano

Lista de figuras

Figura 1.	Anatomía del cérvix.....	1
Figura 2.	Epitelio escamoso del exocérvix.....	3
Figura 3.	Epitelio columnar del endocérvix.....	4
Figura 4.	Imagen colposcópica del cérvix.....	6
Figura 5.	Tasa de incidencia y mortalidad por tipo de cáncer en México....	8
Figura 6.	Cápside del VPH.....	10
Figura 7.	Genoma de VPH16.....	11
Figura 8.	Ciclo de vida del VPH en el epitelio escamoso estratificado.....	12
Figura 9.	Reconocimiento de PAMPs mediante PRRs.....	15
Figura 10.	Microbiota vaginal.....	18
Figura 11.	Cuestionario para evaluar factores de riesgo de desarrollo de CaCU asociado a infección por VPH.....	27
Figura 12.	Esquema de trabajo para la detección del VPH.....	28
Figura 13.	Genotipificación de VPH en MCV.....	39
Figura 14.	Determinación de presencia de VPH en MCV mediante ELISA...	40
Figura 15.	Determinación de presencia de VPH en MCV mediante Microscopía electrónica.....	42
Figura 16.	Microscopía electrónica de células bacterianas presentes en el MCV.....	42
Figura 17.	Diversidad bacteriana.....	44
Figura 18.	Diversidad bacteriana por tipo viral.....	45
Figura 19.	Composición de la microbiota a nivel <i>phylum</i>	46
Figura 20.	Composición de la microbiota a nivel género.....	47
Figura 21.	Análisis de LEfSe.....	48
Figura 22.	Concentración de IL-18 en MCV.....	49
Figura 23.	Correlación entre marcadores de inflamación y géneros bacterianos.....	52
Figura 24.	Mapa de interacción VPH-microbiota-inflamación.....	54
Figura 25.	Interacción entre VPH y microbiota vaginal.....	62

Lista de tablas

Tabla 1.	Oligonucleótidos utilizados para la detección de VPH en MCV por PCR.....	29
Tabla 2.	Programa de PCR para la detección de VPH en MCV.....	30
Tabla 3.	Características de la población de estudio.....	37
Tabla 4.	Citocinas presentes en el MCV.....	50
Tabla 5.	Quimiocinas presentes en el MCV.....	51

Resumen

La infección persistente por el Virus del Papiloma Humano (VPH) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCU). Histológicamente el cérvix está recubierto por un epitelio escamoso estratificado en la parte que protruye hacia la vagina y un epitelio columnar secretor de moco cérvico-vaginal (MCV) en el canal endocervical. Actualmente, la transformación del epitelio escamoso por el VPH ha sido ampliamente caracterizada; en contraste, el papel de este virus en el desarrollo de lesiones en el epitelio glandular no ha sido dilucidado.

La eversión glandular es un proceso en el cual el epitelio columnar se expone al canal vaginal y aunque esta condición es considerada normal, se le ha propuesto como factor de riesgo para la adquisición de infecciones de transmisión sexual como *C.trachomatis*, VIH y VPH. La eversión glandular se puede considerar un modelo para el estudio del VPH en la transformación endocérvix.

En un primer trabajo, se evaluó la presencia del VPH en biopsias provenientes de mujeres con eversión glandular. Como resultado se obtuvo que el 56% de la población estaba infectada con VPH, siendo los subtipos 16, 31 y 18 los más prevalentes. Adicionalmente, en este estudio la presencia del VPH en el MCV fue confirmada mediante PCR, ELISA y Microscopía Electrónica de Transmisión.

Por otro lado, debido a que la infección persistente por VPH ha sido asociada a inflamación crónica y a cambios en la composición de la microbiota vaginal; se evaluaron estas dos características en el MCV. Como resultado se obtuvo que en las muestras VPH+ hubo una mayor concentración de IL-21, MIG y CXCL5, además de una modificación en la microbiota dada por la disminución de *Lactobacillus* y el aumento de bacterias anaerobias como *Atopobium*, *Shuttleworthia* y *Parvimonas*, entre otras. Al contrario, en las muestras VPH- la microbiota estuvo principalmente compuesta por *Lactobacillus*. Además, la presencia de este género bacteriano tuvo una correlación negativa con IL-1 β e IL-22. De este trabajo se puede concluir que la presencia del VPH en el MCV de mujeres con eversión glandular está acompañada de cambios en la microbiota vaginal y en el microambiente inflamatorio.

Abstract

Persistent Human Papillomavirus (HPV) infection is the main risk factor for the development of cervical cancer. Histologically, the cervix is lined by a stratified squamous epithelium in the region that protrudes into the vagina, and a mucus-secreting simple columnar epithelium in the endocervical canal. Currently, the transformation of the squamous epithelium by HPV has been widely characterized; in contrast, the role of this virus in the development of lesions in the glandular epithelium has not been elucidated.

Cervical ectropion is a process in which the columnar epithelium is exposed to the vaginal canal and although this condition is considered normal, it has been proposed as a risk factor for the acquisition of sexually transmitted infections such as *C. trachomatis*, HIV and HPV. Cervical ectropion could be considered a model for the study of HPV in endocervix transformation.

In a previous study, the presence of HPV was evaluated in biopsies from women with cervical ectropion. This showed that 56% of the population was infected with HPV, and that HPV 16, 31 and 18 were the most prevalent subtypes. In the current study, the presence of HPV in cervicovaginal mucus was confirmed by PCR, ELISA and Transmission Electron Microscopy.

Since persistent HPV infection has been associated with chronic inflammation and changes in the composition of the vaginal microbiota, these two characteristics were evaluated in the cervicovaginal mucus. As a result, we observed that HPV+ samples had a higher concentration of IL-21, MIG and CXCL5, in addition to a modification in the microbiota due to the decrease in *Lactobacillus* and the increase of anaerobic bacteria such as *Atopobium*, *Shuttleworthia* and *Parvimonas*. On the contrary, the microbiota in the HPV- samples was mainly composed of *Lactobacillus*. Furthermore, the presence of this bacterial genus had a negative correlation with IL-1 β and IL-22. From this study, we can conclude that the presence of HPV in the cervicovaginal mucus of women with cervical ectropion is accompanied by changes in the vaginal microbiota and in the inflammatory microenvironment.

1. Introducción

1.1 Cérvix

Anatomía

El cérvix o cuello uterino es una estructura que corresponde a la porción inferior del útero y comunica con la vagina (Figura 1). Esta estructura tiene forma de cono y se divide en dos partes: la porción supravaginal y la porción vaginal. La porción vaginal o exocérvix protruye hacia la vagina y es aquella que se puede observar durante las inspecciones colposcópicas. Además, presenta en su centro una abertura conocida como os (os del latín boca u orificio) externo, que permite la comunicación de la cavidad uterina con la vagina a través de un conducto llamado canal endocervical o endocérvix. Por otra parte, la porción supravaginal, que no es visible mediante examinación vaginal, está delimitada por el os interno, el cual se encuentra en el borde superior del conducto endocervical (Grover A. & Pandey D. 2017).

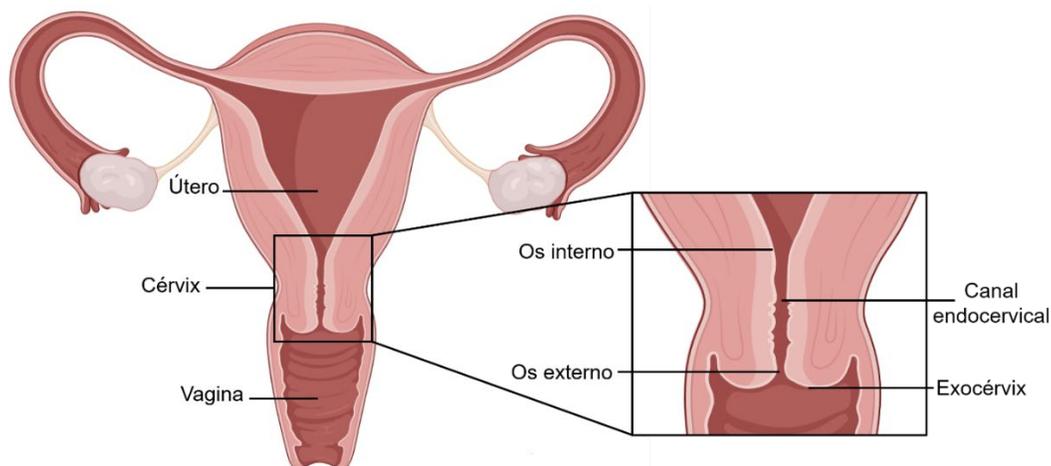


Figura 1. Anatomía del cérvix. Ubicación del cérvix dentro del aparato reproductor femenino. Del lado derecho se muestran las secciones que componen al cérvix: Os interno, canal endocervical, os externo y exocérvix. Figura realizada en Biorender.

La forma y tamaño del cérvix varían dependiendo de la edad, paridad y situación hormonal de la mujer. En una mujer nulípara, el cérvix mide alrededor de 3 cm de longitud y entre 1 y 3 cm de diámetro (Grover A. & Pandey D. 2017). Por otro lado, tras el parto, debido a la dilatación del cérvix, tanto su longitud como diámetro pueden variar. Además, la forma del os externo pasa de ser redonda a ser alargada en el sentido horizontal. Su forma también se modifica transitoriamente durante el ciclo menstrual agrandándose durante la ovulación (Weismiller, D. G. 2008).

Histología

La pared del cérvix está compuesta principalmente por tejido fibroso y una pequeña porción de músculo liso en la periferia. Asimismo, está constituido por dos tipos de epitelio: el exocérvix recubierto por un epitelio escamoso estratificado no queratinizado y el endocérvix revestido por un epitelio columnar o cilíndrico, unidos mediante la unión escamocolumnar (Ross, M. H. & Wojciech, P. 2016).

Epitelio escamoso estratificado

El epitelio escamoso estratificado está conformado por cuatro capas o estratos celulares con distintos niveles de diferenciación celular (Figura 2). A medida que progresa la diferenciación, las células crecen, aumenta la cantidad de citoplasma y disminuye el tamaño nuclear. El estrato más interno, conocido como estrato basal, se encuentra sobre la membrana basal que divide al epitelio del estroma. Éste se compone por una monocapa de células poco diferenciadas con una relación núcleo-citoplasma alta y una tasa mitótica elevada. La siguiente capa, el estrato parabasal, está formada por células de mayor tamaño, con morfología poliédrica y una proporción núcleo-citoplasma menor que la de las células basales. Sobre el estrato parabasal se encuentra el estrato intermedio; el cual consiste en células con morfología alargada o fusiforme con núcleo pequeño y citoplasma lleno de vacuolas y glucógeno. Finalmente, la capa más externa es el estrato superficial caracterizado por células terminalmente diferenciadas, de morfología plana y alargada con núcleos picnóticos. El citoplasma de estas células contiene distintas cantidades de queratina y colágeno (Grover A. & Pandey D. 2017; Ross, M. H. & Wojciech, P. 2016; Singer, A. & Jordan, J. A. 2006).

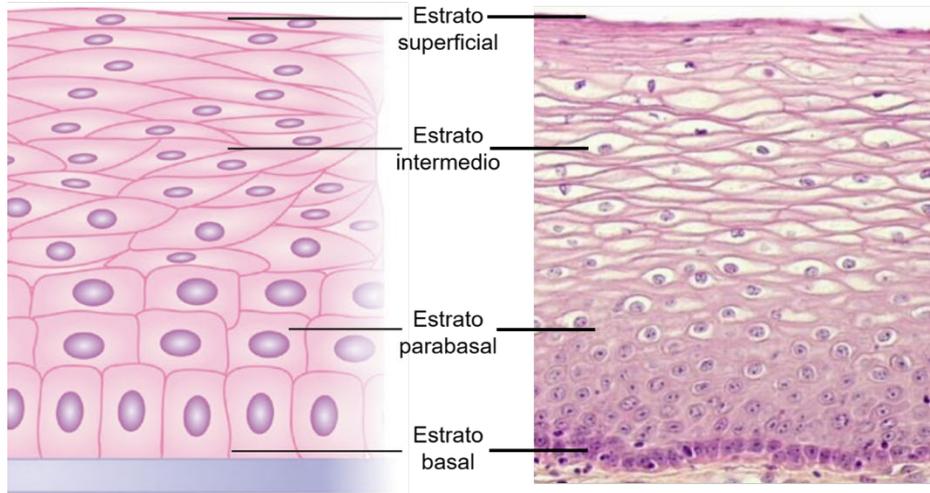


Figura 2. Epitelio escamoso del exocérnix. El epitelio escamoso está compuesto por cuatro estratos: basal, parabasal, intermedio y superficial. Modificada de Grover A. & Pandey D. 2017; Ross, M. H. & Wojciech, P. 2016.

Los factores que determinan el grosor del epitelio y su diferenciación normal son la edad y el estado hormonal. En este sentido, la progesterona es responsable del engrosamiento del estrato parabasal mientras que el estrógeno se encarga de la proliferación, maduración y descamación del epitelio escamoso. Por lo tanto, durante la etapa reproductiva, el epitelio es alto y bien diferenciado; mientras que en la postmenopausia las células no se diferencian más allá de la etapa parabasal dando lugar a un epitelio delgado y atrófico (Dallenbach-Hellweg, G. *et al.*, 2006; Grover A. & Pandey D. 2017).

Epitelio columnar

El epitelio columnar (Figura 3A), localizado en el endocérnix, está constituido por una monocapa de células cilíndricas polarizadas con el núcleo localizado cerca de su porción basal y un citoplasma lleno de vacuolas mucinosas (Tatti, S. A. *et al.*, 2011). Debajo de la monocapa celular, se puede observar una capa de células cúbicas conocidas como células de reserva. Este tipo celular se caracteriza por su bipotencialidad, ya que pueden diferenciarse tanto a células cilíndricas como a células escamosas y producir tanto mucina como queratina (Dallenbach-Hellweg, G. *et al.*, 2006).

El epitelio columnar no forma una superficie lisa, sino que forma pliegues dentro del canal cervical conocidos como proyecciones papilares (Grover A. & Pandey D. 2017). Estas invaginaciones de 5-8 mm en el estroma cervical dan lugar a las criptas endocervicales (Figura 3B); las cuales también son conocidas como glándulas endocervicales debido a la morfología redondeada; aunque no son glándulas verdaderas puesto a que carecen de una estructura ductal o acinar (O'Connor, D. M. 2008).

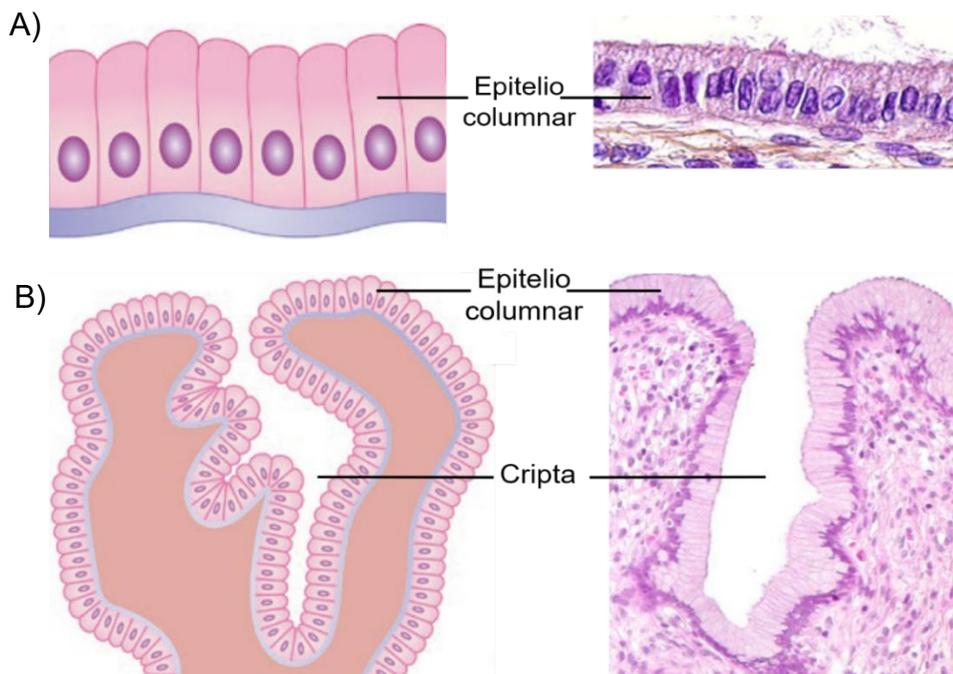


Figura 3. Epitelio columnar del endocérvix. A) El epitelio columnar compuesto por una monocapa de células cilíndricas polarizadas sobre la membrana basal. **B)** Cripta del epitelio columnar del endocérvix. Modificada de Grover A. & Pandey D. 2017; Ross, M. H. & Wojciech, P. 2016; Monroy, O. 2017.

Las células del epitelio columnar producen y secretan el moco que permite la lubricación del cérvix y la vagina. El moco cérvico-vaginal (MCV) es una mezcla compleja de agua, lípidos, colesterol, carbohidratos, iones inorgánicos y proteínas. Entre las proteínas que componen al moco se encuentran inmunoglobulinas (Ig), sialidasas y mucinas. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular que le brindan la estructura tipo gel al moco (Han, L. *et al.*, 2017; Taherali, F. *et al.*, 2018). La cantidad y propiedades tanto físicas como químicas del moco secretado cambia durante las fases del ciclo menstrual mediante la acción de las hormonas. De este modo, durante la primera mitad del ciclo menstrual, el moco es escaso, grueso y

viscoso, y forma una barrera que no permite la entrada de espermatozoides. Justo antes de la ovulación, gracias a la producción de estrógeno, la viscosidad del moco disminuye mientras que su volumen aumenta 10-20 veces y es denominado moco estrogénico. Posterior a la ovulación, la síntesis de progesterona induce una reducción en la cantidad del moco y éste se vuelve más grueso y pegajoso, llamado moco gestativo (Grande, G. *et al.*, 2015).

Unión escamocolumnar

Entre el epitelio escamoso y el epitelio columnar se ubica la unión escamocolumnar (UEC). Su localización se modifica de acuerdo a diversos factores como la edad, la fase del ciclo menstrual, el embarazo y el número de partos. De esta manera, antes de la primera menstruación, la unión escamocolumnar se encuentra a la altura del os externo. Con el crecimiento y desarrollo del aparato reproductor femenino durante la pubertad, el canal endocervical se elonga gracias a la acción del estrógeno, lo cual causa que la UEC se protruya hacia la vagina (Sellors, J. W. & Sankaranarayanan, R., 2003). El epitelio columnar, al ser expuesto al ambiente vaginal, es reemplazado por epitelio escamoso estratificado mediante dos posibles procesos: la proliferación del epitelio escamoso adyacente o por metaplasia, un proceso en el cual las células de reserva del epitelio columnar se diferencian a células escamosas. De esta forma se crea una nueva UEC; el área que se encuentra entre la UEC original y la nueva se le denomina zona de transformación. Si el recambio de epitelio continúa, se puede generar un crecimiento desordenado conocido como displasia. Cuando los cambios displásicos son marcados y afectan el grosor del epitelio, pueden llevar al desarrollo de una neoplasia preinvasiva o carcinoma *in situ*. Debido a que la mayoría de los carcinomas de cérvix se originan en esta área, la zona de transformación es de gran interés en el estudio del cáncer cervical (Singer, A. & Jordan, J. A. 2006; Stricker, T. P. *et al.*, 2010).

Eversión glandular

La eversión glandular, ectopia cervical o ectropión es un hallazgo normal del cérvix, donde las células columnares del endocérvix se extienden más allá del os externo,

llegando a la porción vaginal del cérvix. Esta eversión ha sido asociada a la exposición a elevados niveles de estrógeno como sucede durante la pubertad, el embarazo o por el uso de anticonceptivos hormonales. Mediante una inspección colposcópica se puede observar la eversión glandular como una zona cerca del os externo de color rojizo y textura granular respecto al tejido circundante (Figura 4) (Jacobson, D. L. *et al.*, 2000; Grover A. & Pandey D. 2017). Debido a que la eversión glandular es una condición fisiológica que puede revertirse mediante epitelización o metaplasia, solo se considera tratamiento cuando se presentan molestias como exceso de flujo o sangrado. Cuando está indicado, este tejido ectópico se puede retirar mediante electrocirugía, criocauterización, cauterización con láser o tratamiento químico/farmacológico (Machado Junior, L. C. *et al.*, 2008).

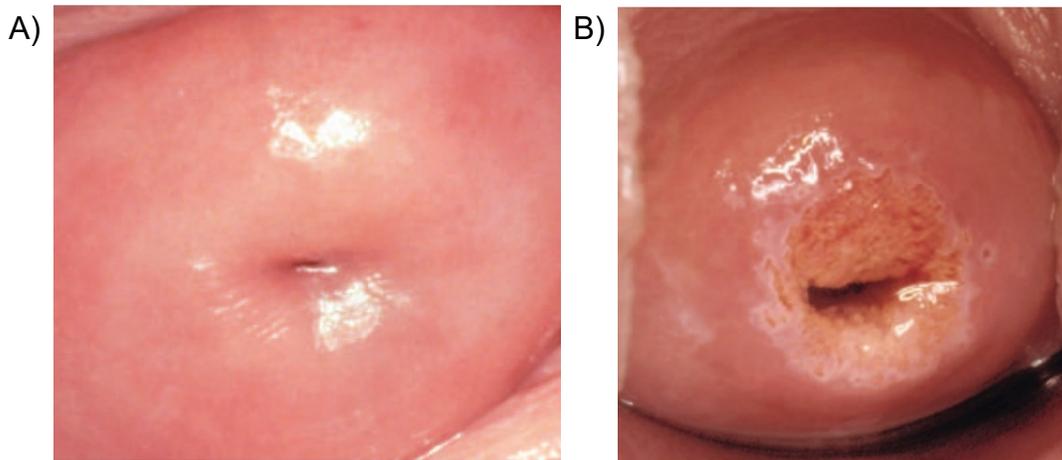


Figura 4. Imagen colposcópica del cérvix. A) Cérvix normal **B)** Cérvix con eversión glandular la cual se observa como región rojiza alrededor del os externo con textura granular. Tomado de O'Connor, D. M. 2008.

1.2 Cáncer Cervicouterino

El término cáncer engloba a un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento maligno, autónomo y descontrolado de células y tejidos, causando tumores. Estos tumores pueden invadir el tejido adyacente y diseminarse a otros órganos (WHO, 2006). El cáncer cervicouterino (CaCU) es el término utilizado para describir a los tumores que surgen del cérvix.

Tipos de cáncer cervicouterino

Como se mencionó previamente, el cérvix está recubierto por dos tipos distintos de epitelios: el epitelio escamoso estratificado y el epitelio columnar, de los cuales se pueden desarrollar el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma cervical respectivamente. Los tumores en el cérvix se desarrollan a partir de precursores preinvasivos también conocidos como tumores *in situ*.

El carcinoma de células escamosas es el tipo histológico de CaCU más común y representa alrededor del 70% de los casos reportados para esta neoplasia (Cohen, P. A. *et al.*, 2019). Las lesiones que preceden al carcinoma de células escamosas se clasifican como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) en grados 1 a 3 dependiendo de la severidad de la alteración morfológica estructural en el epitelio (Hedrick Ellenson, L. & Pirog, E. C. 2010). Estas lesiones también pueden ser clasificadas como lesiones escamosas intraepiteliales de bajo (LSIL) y alto (HSIL) grado. La mayoría de las lesiones de bajo grado se pueden revertir, pero conforme esta lesión progresa, el daño aumenta y se puede llegar al desarrollo de un carcinoma *in situ* (Prediville, W. & Sankaranarayanan, R., 2017).

Por otro lado, el adenocarcinoma de cérvix representa el 25% del total de casos de CaCU (Cohen, P. A. *et al.*, 2019). En la lesión precursora del adenocarcinoma invasor del endocérvix, conocida como adenocarcinoma *in situ*, el epitelio columnar es reemplazado por un epitelio no polarizado caracterizado por células de gran tamaño, con núcleos hipercromáticos, que tienen una alta tasa mitótica y una baja producción de mucina (Sellors, J. W. & Sankaranarayanan, R., 2003). El 5% de los casos restantes de CaCU están conformados por carcinomas adenoescamosos y neuroendócrinos (Hedrick Ellenson, L. & Pirog, E. C. 2010).

Epidemiología

El CaCU es el cuarto tipo de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial y es causante de más de 310,000 muertes al año. Según la Agencia Internacional para el Estudio del Cáncer (IARC), el CaCU es la segunda neoplasia con mayor incidencia en mujeres mexicanas, ocupando el segundo lugar de muertes al año asociadas a cáncer en México (Figura 5) (Ferlay, J. *et al.*, 2018).

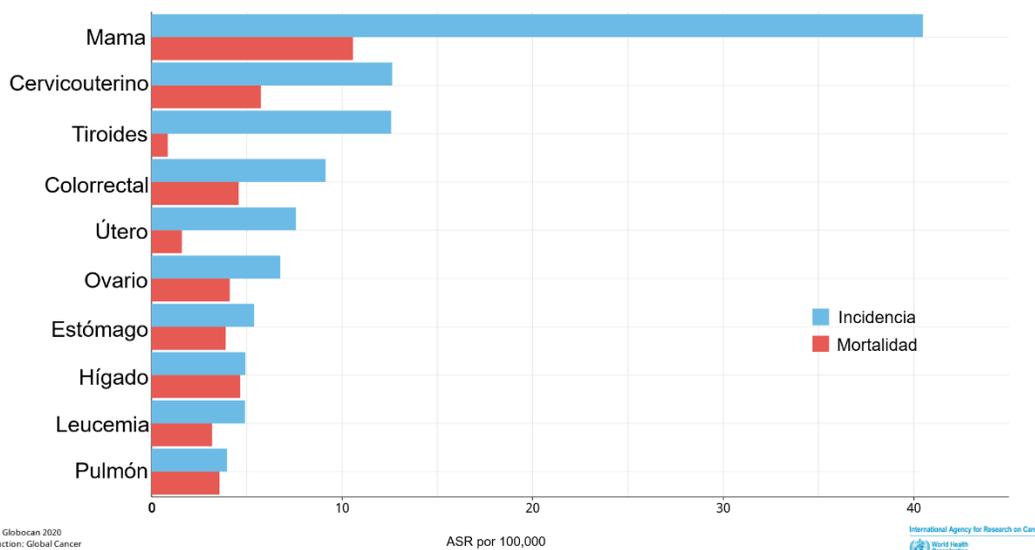


Figura 5. Tasa de incidencia y mortalidad por tipo de cáncer en México. El CaCU tiene el segundo lugar en incidencia y mortalidad en mujeres mexicanas. Modificada de Globocan 2020.

Aunque el CaCU es la cuarta neoplasia más común a nivel mundial, el 85% de los casos nuevos ocurren en países en desarrollo. Adicionalmente, se reportó que en 2015 el 90% de las muertes relacionadas al CaCU ocurrieron en países en desarrollo, donde la mortalidad es 18 veces mayor que en países desarrollados (Cohen, P. A. *et al.*, 2019).

En países desarrollados de Europa y América se ha reportado una disminución en la incidencia del carcinoma de células escamosas y un aumento en la incidencia del adenocarcinoma de cérvix en los últimos años (van der Horst, J. *et al.*, 2017). Previo a 1970 esta última neoplasia representaba solamente el 5% del CaCU, mientras que ahora simboliza entre el 15-25% de los casos de CaCU dependiendo del país (Fujiwara, K. *et al.*, 2014; Nogueira-Rodrigues, A. *et al.*, 2014). Este aumento se debe principalmente a un incremento en el número de casos en mujeres jóvenes menores a 55 años (van der Horst, J. *et al.*, 2017). Además, este tipo de cáncer es más agresivo que el carcinoma de células escamosas y tiene un peor pronóstico (Fujiwara, K. *et al.*, 2014).

La disminución en la incidencia del CaCU en los últimos 30 años se debe a la introducción de programas de detección temprana y al desarrollo de vacunas profilácticas. Estos programas de tamizaje han tenido un impacto positivo en la detección temprana y tratamiento del carcinoma de cérvix pero tienen limitaciones

con respecto a la detección del adenocarcinoma; debido principalmente a la inaccesibilidad del endocérnix (Ruba, S. *et al.*, 2004). Por lo mismo, se generan falsos negativos en el 50% de las pruebas de detección de adenocarcinoma lo cual no permite que haya una detección temprana de esta neoplasia (Umezawa, T. *et al.*, 2015).

Factores de riesgo

Los factores de riesgo asociados tanto al CaCU como a sus lesiones precursoras son la edad de inicio de la vida sexual activa (IVSA), el número de parejas sexuales (Burk, R. D. *et al.*, 1996), número de embarazos, y el uso prolongado de anticonceptivos hormonales (Smith, J. S. *et al.*, 2003), entre otros.

En 1976 Harald zur Hausen propuso que el Virus del Papiloma Humano (VPH) tenía una relación con el CaCU debido a que este estaba presente en las verrugas genitales o condilomas y que estas podían volverse lesiones malignas. Posteriormente, se identificó la presencia de DNA de VPH en biopsias de CaCU y se determinó que los tipos más comunes eran el 6, 11, 16 y 18 (Dürst, M. *et al.*, 1983). Gracias a estas aportaciones, zur Hausen recibió el Premio Nobel en 2008. Actualmente, se ha determinado la presencia del VPH en el 99% de los tumores que se originan en el cérnix y que los genotipos con mayor prevalencia son el 16 y el 18 (Walboomers, J. M. M. *et al.*, 1999).

1.3 Virus del Papiloma Humano

Los VPH taxonómicamente pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, la cual está conformada por virus pequeños no envueltos con DNA circular de doble cadena que son capaces de infectar la piel y mucosa de distintas especies animales (Schiffman, M. *et al.*, 2016). Su cápside icosaédrica tiene un diámetro de alrededor de 55nm y está compuesta por 72 capsómeros pentaméricos arreglados en una conformación T=7 (Figura 6). Las proteínas estructurales que le dan forma a la cápside son la proteína mayoritaria de la cápside (L1) y la proteína minoritaria de la cápside (L2) (Howley, P. M. & Lowy, D. R., 2004).

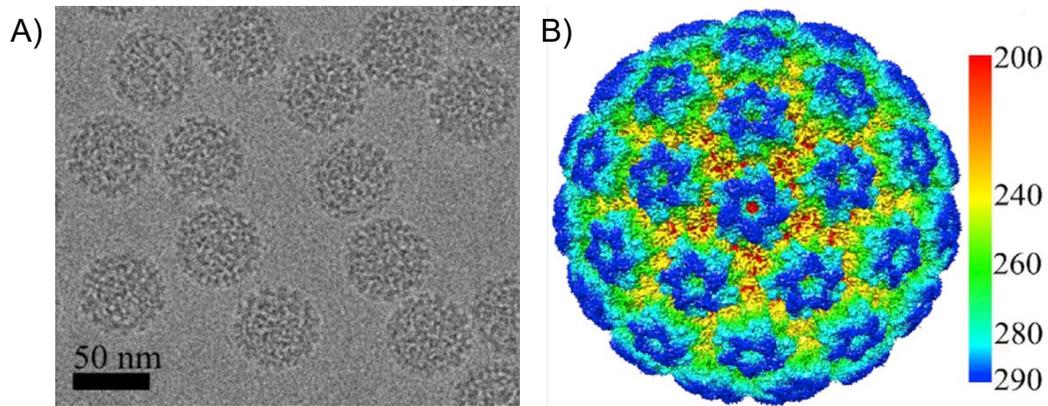


Figura 6. Cápside del VPH. (A) Criomicroscopía electrónica de cápsides de VPH. (B) Reconstrucción tridimensional del análisis de criomicroscopía electrónica de la estructura de las partículas virales coloreado radialmente según distancia del centro de la cápside (ángstrom). Tomado y modificado de Guan, J. *et al.*, 2017.

Se conocen más de 200 tipos de VPH categorizados en 5 géneros filogenéticos: Alfa, Beta, Gamma, Mu y Nu (de Villiers, E. *et al.*, 2004; Bzhalava, D. *et al.*, 2015). El género alfa contiene a los tipos virales que causan CaCU, cáncer en el tracto genital inferior, cáncer anal y en la orofaringe. De tal manera que cada tipo de VPH se ha adaptado evolutivamente a un tipo particular de tejido epitelial (Schiffman, M. *et al.*, 2016). Su clasificación es determinada por las diferencias en el marco de lectura del gen L1. Cuando la secuencia de este gen difiere en un 10% de las secuencias reportadas hasta el momento, se considera un tipo nuevo de VPH (Bernard, H. *et al.*, 2010). Además, se les puede clasificar según su potencial oncogénico; los virus de alto riesgo inducen el desarrollo de tumores y los de bajo riesgo favorecen el desarrollo de condilomas y otras lesiones. Los tipos virales de alto riesgo incluyen a los VPH 16, 18 y 31, mientras que los de bajo riesgo más comunes son los VPH 6 y 11 (zur Hausen, H. 2002).

Los VPH tienen un genoma de DNA circular bicatenario (de alrededor de 8kb) dividido en tres regiones: la región larga de control (LCR), la región de expresión temprana (E) y la región de expresión tardía (L) (Figura 7). En la LCR se encuentra el origen de replicación y el sitio de poliadenilación tardía (AL). Por otra parte, la región temprana ocupa alrededor del 50% del genoma y en ella se encuentran los genes E1-E7. Éstos se transcriben a partir del promotor primario (p_{97}) y están implicados en la replicación, transcripción, evasión del sistema inmune y control del

ciclo celular. Finalmente, la región L codifica los genes que se expresan a partir del promotor tardío (p_{670}) y componen la cápside viral (L1 y L2) (Fehrmann, F. & Laimins, L. A. 2003; Stanley, M. 2010).

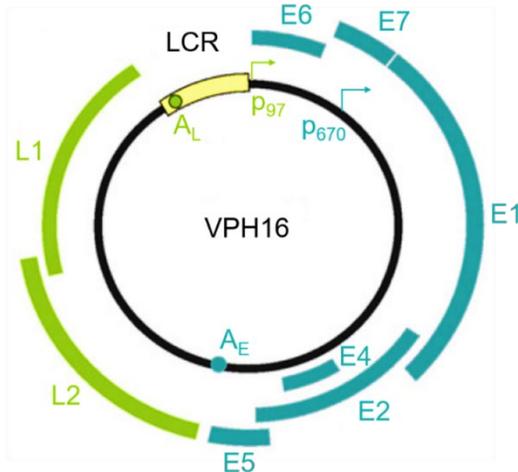


Figura 7. Genoma de VPH16. Se muestran los 8 marcos abiertos de lectura del genoma de VPH16: la región temprana (azul) y la región tardía (verde). También se observan los dos sitios de poliadenilación temprano (AE) y tardío (AL) y los promotores temprano (p_{97}) y tardío (p_{670}). Tomado y modificado de Stanley, M. 2010.

Ciclo de vida y transformación

Para que el VPH lleve a cabo la infección, es necesario que el virus llegue al estrato basal del epitelio escamoso estratificado. Esto generalmente se debe a la existencia de microlesiones en el epitelio cervical y una vez que el virus llega al estrato basal, es internalizado por las células basales (Schiffman, M. *et al.*, 2016). Hasta el momento existe controversia sobre el mecanismo de internalización viral, pero se ha propuesto que los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) tienen un papel importante en la unión inicial del virus a la célula. Los HSPGs son glicoproteínas unidas covalentemente a cadenas lineales de heparán sulfato (HS) que se categorizan en tres grupos: membranales, secretados a la matriz extracelular y los presentes en vesículas secretoras. Estos proteoglicanos participan en la organización de la membrana basal, en la presentación de citocinas y pueden funcionar como receptores y correceptores de endocitosis (Sarrazin, S. *et al.*, 2011).

De esta forma, una vez que el virus llega al estrato basal del epitelio escamoso estratificado (Figura 8), la proteína L1 de la cápside viral interactúa con el HS causando un cambio conformacional que expone el N-terminal de la proteína L2. Esto permite que L2 sea escindida por furina, siendo un paso importante para el

proceso de internalización del virus. Uno de los segundos receptores que se ha propuesto para la internalización del virus es la $\alpha 6$ integrina, la cual inicia una cascada de señalización que lleva a la endocitosis del virus mediada por clatrina y caveolina. Este proceso ha sido altamente estudiado en VPH16, pero se ha sugerido que distintos virus pueden usar diferentes receptores y vías de internalización (Raff, A. B. *et al.*, 2013).

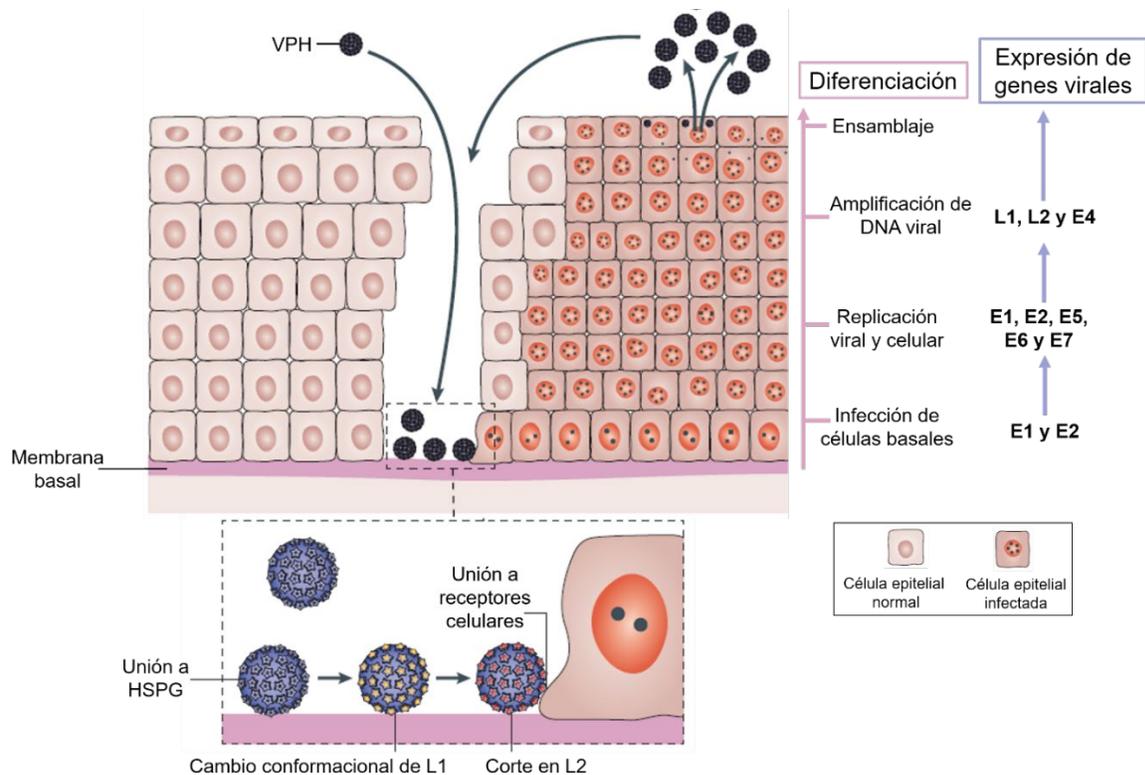


Figura 8. Ciclo de vida del VPH en el epitelio escamoso estratificado. Las microlesiones permiten la llegada del VPH a la membrana basal. Ahí, el virus se une a los HSPGs mediante la proteína L1. Esto causa un cambio conformacional que expone a L2 y permite su escisión por furina. Posterior a la internalización del virus, se lleva a cabo la replicación y expresión de proteínas virales necesarias para la proliferación celular y replicación viral (E1, E2, E5, E6 y E7). En las células terminalmente diferenciadas del estrato superficial se lleva a cabo el ensamblaje de los viriones con las proteínas L1 y L2 y estos son liberados tras la degradación de los filamentos de citoqueratina por E4. El ciclo de vida se completa sin causar muerte celular y sin inflamación lo cual evita que se active la respuesta inmune local. Tomado y modificado de Roden, R. B. S. & Stern, P. L. 2018.

El ciclo viral del VPH depende del programa de diferenciación del epitelio escamoso estratificado, de forma que las distintas proteínas del virus se expresan diferencialmente a lo largo de los estratos del epitelio (Figura 8). En las células basales se expresan E1 y E2, las cuales participan en la replicación del genoma y

la segunda particularmente funciona como reguladora de las proteínas E6 y E7. En los siguientes estratos celulares se expresan el resto de las proteínas de expresión temprana. En el estrato superficial se expresan las proteínas L1 y L2 para el ensamblaje de las partículas virales. Finalmente, la proteína E4 disrumpe los filamentos de citoqueratina, lo cual permite que las partículas virales sean liberadas y causa que los queratinocitos del estrato superficial se desprendan del epitelio. De esta forma, el ciclo viral se completa sin causar lisis celular y sin activar al sistema inmune (Roden, R. B. S. & Stern, P. L. 2018).

La transformación del epitelio mediada por VPH se debe a la expresión de oncoproteínas virales además de la integración del genoma viral al del hospedero; esta integración ha sido observada en más del 70% de los tumores (Vojtechova, Z. *et al.*, 2016; Nkili-Meyong, A. *et al.*, 2019). Al integrarse el genoma se pierde E2, lo cual permite la progresión aberrante del ciclo celular gracias a la expresión de E6 y E7. Esta última tiene un sitio de unión a DNA y es capaz de unirse a una serie de factores celulares. Una de sus interacciones mejor caracterizada es con la proteína del retinoblastoma (Rb) la cual controla la transición G1-S del ciclo celular. Además, la unión de E7 a Rb libera al factor de transcripción E2F y promueve la progresión del ciclo celular, diferenciación y mitosis. Por otro lado, E6 se une a reguladores del ciclo celular y proteínas supresoras de tumores como p53 mediante la ubiquitin ligasa E6AP marcándola para degradación por el proteasoma. Sin p53 no hay arresto del ciclo celular ni apoptosis en respuesta a daño al DNA y las células siguen proliferando sostenidamente (Moody, C. A. & Laimins, L. A. 2010). De esta forma, la integración del genoma viral genera inestabilidad genómica, proliferación sostenida e inmortalización celular.

El papel del VPH en la transformación del epitelio escamoso estratificado ha sido ampliamente estudiado, pero hasta la fecha no se conoce su papel en la transformación del epitelio columnar (Pirog, E. C. *et al.*, 2000; An, H. *et al.*, 2005). Aunque el virus sí puede infectar a las células, éstas son clasificadas como no permisivas ya que no presentan el programa de diferenciación celular necesario para la replicación del virus (Doorbar, J., & Griffin, H. 2019).

1.4 VPH y respuesta inflamatoria

Desde el punto de vista fisiológico, la inflamación es un proceso que sirve para la eliminación del agente causal de la infección, reparar el daño y regresar a un estado de homeostasis, pero es un proceso altamente dañino para el cuerpo; por lo tanto, existen una serie de mecanismos para controlar la respuesta inflamatoria una vez que se elimina el patógeno (Owen, J. A. *et al.*, 2014). Si el patógeno no es eliminado o los mecanismos de control de la inflamación no funcionan, la inflamación aguda se puede convertir en una inflamación crónica. Durante la inflamación crónica distintas células incluyendo leucocitos, producen leucotrienos y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno las cuales causan daño al DNA. De igual forma, algunas células del sistema inmune liberan prostaglandinas, lo cual aumenta la inflamación y puede tener un impacto en distintas vías carcinogénicas (Fernandes, J. V. *et al.*, 2015).

En este sentido, la respuesta inmune contra los virus se activa inmediatamente tras su entrada al cuerpo. Este proceso ocurre debido a que las células del sistema inmune tienen receptores de reconocimiento de patrones (PRRs: Pattern recognition receptors), los cuales detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns). Existen dos tipos de PRRs que reconocen PAMPs virales: los receptores tipo Toll (TLRs) y los receptores tipo RIG-I (RLRs). Estos PRRs se pueden localizar en la superficie celular (TLR 2, 4), en el citoplasma (RIG-I y MDA-5) o en compartimientos intracelulares como endosomas (TLR 3, 7, 8, 9) (Louten, J. & Reynolds, N. 2016).

La unión del PAMP al PRR activa una cascada de señalización intracelular que induce la transcripción de genes específicos como citocinas. Inicialmente, tras la infección viral la célula infectada produce interferones (IFN) de tipo I: IFN- α e IFN- β ; los cuales son liberados al medio extracelular y estimulan la síntesis de genes activados por IFN en las células cercanas y células del sistema inmune (Louten, J. & Reynolds, N. 2016). Asimismo, en conjunto todas estas células sintetizan citocinas para amplificar la señal inicial; entre éstas se encuentran el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), las interleucinas (IL) 1- β , 6 y 12 y el IFN- γ (Figura 9). De igual

forma, se producen quimiocinas como la IL-8 o CXCL8 la cual sirve para el reclutamiento de células del sistema inmune innato como células NK, macrófagos y células dendríticas. Estas citocinas y quimiocinas actúan sobre el sistema inmune, el sistema hematopoyético, el sistema nervioso y el hígado, lo cual genera un efecto sistémico que facilita la contención de la infección (Flint, S. J. *et al.*, 2015).

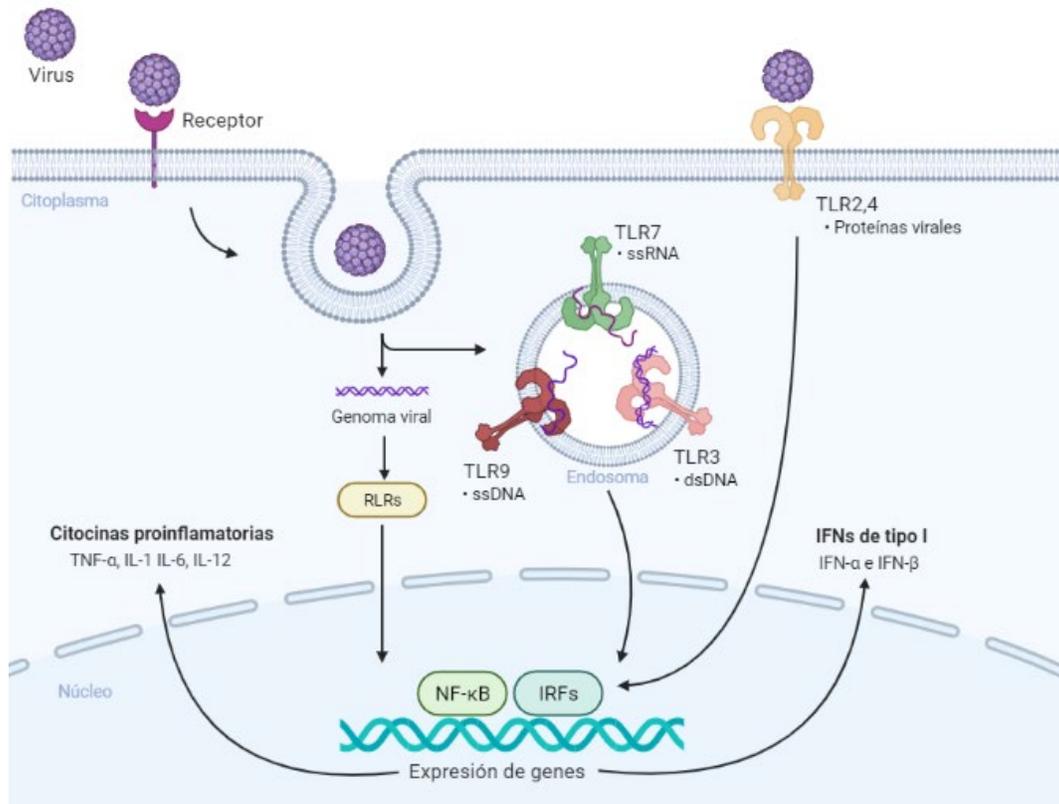


Figura 9. Reconocimiento de PAMPs mediante PRRs. Los PRRs se encuentran en distintos compartimentos celulares: TLR2 y TLR4 en la membrana plasmática; TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 dentro de endosomas; y los RLRs en el citoplasma. La unión del PAMP al PRR activa una cascada de señalización intracelular que lleva a la activación de NF-κB o IRFs (IRF3, IRF7) para inducir la expresión de citocinas proinflamatorias e IFNs de tipo I. Figura realizada en Biorender.

La quimioatracción de las células dendríticas al sitio de infección permite que estas fagociten las partículas virales y posteriormente viajen a los nódulos linfáticos donde, tras el procesamiento de estas partículas, se puedan presentar como péptidos en los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y actúen como antígeno que estimule a los linfocitos T. Estos linfocitos pueden ser clasificados en linfocitos T citotóxicos (CTL) y linfocitos cooperadores (T_H). Los CTL secretan TNF- α , IFN- γ y gránulos citotóxicos (perforina y granzima) para la

eliminación de la célula infectada. De igual forma, pueden causar la apoptosis de la célula mediante las interacciones Fas/FasL. Por otro lado, los T_H sintetizan citocinas y factores de crecimiento que activan a los CTLs y a los linfocitos B (Flint, S. J. *et al.*, 2015). Actualmente se han descrito varios tipos de linfocitos T_H: los más estudiados son los T_H1 y T_H2, los primeros clásicamente actúan contra la infección por parásitos y en procesos alérgicos promoviendo una respuesta proinflamatoria al secretar IFN- γ e IL-2; mientras que los segundos actúan contra la infección por patógenos extracelulares y liberan IL-4, IL-5 e IL-13 (Steinbach, A. & Riemer, A. B. 2018). Otro tipo de linfocitos cooperadores son los T_H17; éstos tienen un papel en el control de infecciones bacterianas y por hongos, secretan IL-17 e IL-21. Además, son un inductor potente de la inflamación y han sido asociados a la inflamación crónica (Owen, J. A. *et al.*, 2014).

En este sentido, el sistema inmune tiene un papel central en la determinación del resultado de la infección por VPH y la respuesta inflamatoria es esencial para la eliminación del virus (Senba, M., & Mori, N. 2012). En la literatura se ha reportado que el DNA de doble cadena del VPH es reconocido por el TLR9, lo cual desencadena la liberación de interferones (IFN- α , IFN- β e IFN- γ) desde la célula infectada que a su vez activa a algunas células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos y células NK para la eliminación del virus (Boccardo, E. *et al.*, 2010). Si el sistema inmune no es capaz de eliminar al virus, se genera una infección persistente y una activación exacerbada de vías inflamatorias que promueven la transformación del epitelio (Tindle, R. W. 2002).

La persistencia de una infección por VPH es esencial para el desarrollo de lesiones y cáncer; esta persistencia puede ser favorecida por la edad, un inmunocompromiso, el uso de anticonceptivos hormonales y la infección por *Chlamydia trachomatis*. Por otro lado, en los últimos años se ha encontrado evidencia de que sugiere que la microbiota vaginal tiene un papel significativo en la persistencia o eliminación del virus, además de una estrecha relación con la carcinogénesis (Mitra, A. *et al.*, 2016).

1.5 Microbiota vaginal y VPH

El término microbiota se refiere a la comunidad de microorganismos que habitan en el ser humano, la cual cambia según el sitio del cuerpo humano donde se encuentre (Kalia, N. *et al.*, 2020).

En la mayoría de las partes del cuerpo, una microbiota diversa es sinónimo de salud. Sin embargo, en el microambiente vaginal este estado de salud (eubiosis), ha sido asociado a una baja diversidad bacteriana (Di Paola, M. *et al.*, 2017). La microbiota vaginal de las mujeres en etapa reproductiva se ha descrito como una microbiota dominada por *Lactobacillus* los cuales previenen la colonización por patógenos mediante la producción de ácido láctico, bacteriocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS); además compiten con otras bacterias por los sitios de adherencia al moco cérvico-vaginal (MCV) y promueven la producción de péptidos antimicrobianos (PAMs) por parte de las células epiteliales y células del sistema inmune (Figura 10 A) (Martin D. H. 2012; Kalia, N. *et al.*, 2020). Por el contrario, cuando las bacterias anaerobias facultativas colonizan la vagina, producen enzimas y metabolitos que degradan el MCV y pueden comprometer la barrera cervical, favoreciendo un estado disbiótico dominado por bacterias patógenas y activando al sistema inmune (Figura 10B) (Borgdorff, H. *et al.*, 2016).

Actualmente, gracias al uso de tecnologías como la secuenciación, se han propuesto 5 tipos de comunidades bacterianas (CST: Community state types) basadas en la abundancia y composición de las especies bacterianas, donde *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* dominan los CST I, II, III y V respectivamente. Por otro lado, el CST IV se caracteriza por tener altas proporciones de bacterias anaerobias facultativas como *Prevotella*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Sneathia*, *Aerococcus*, entre otras (Ravel, J. *et al.*, 2011). En 2012 se propuso una división del CST IV en CST IV-A y IV-B: el primero caracterizado por tener bajas proporciones de especies de *Lactobacillus* junto con algunas especies de bacterias anaerobias facultativas como *Anaerococcus*, *Corynebacterium*, *Fingoldia*, o *Streptococcus*; mientras que el segundo contiene una mayor proporción del género *Atopobium* además de *Prevotella*, *Parvimonas*,

Sneathia, *Gardnerella*, entre otros (Gajer, P. *et al.*, 2012). El CST VI ha sido considerado un estado disbiótico y ha sido asociado con vaginosis bacteriana (BV) y vaginitis aeróbica (AV) (Kalia, N. *et al.*, 2020).

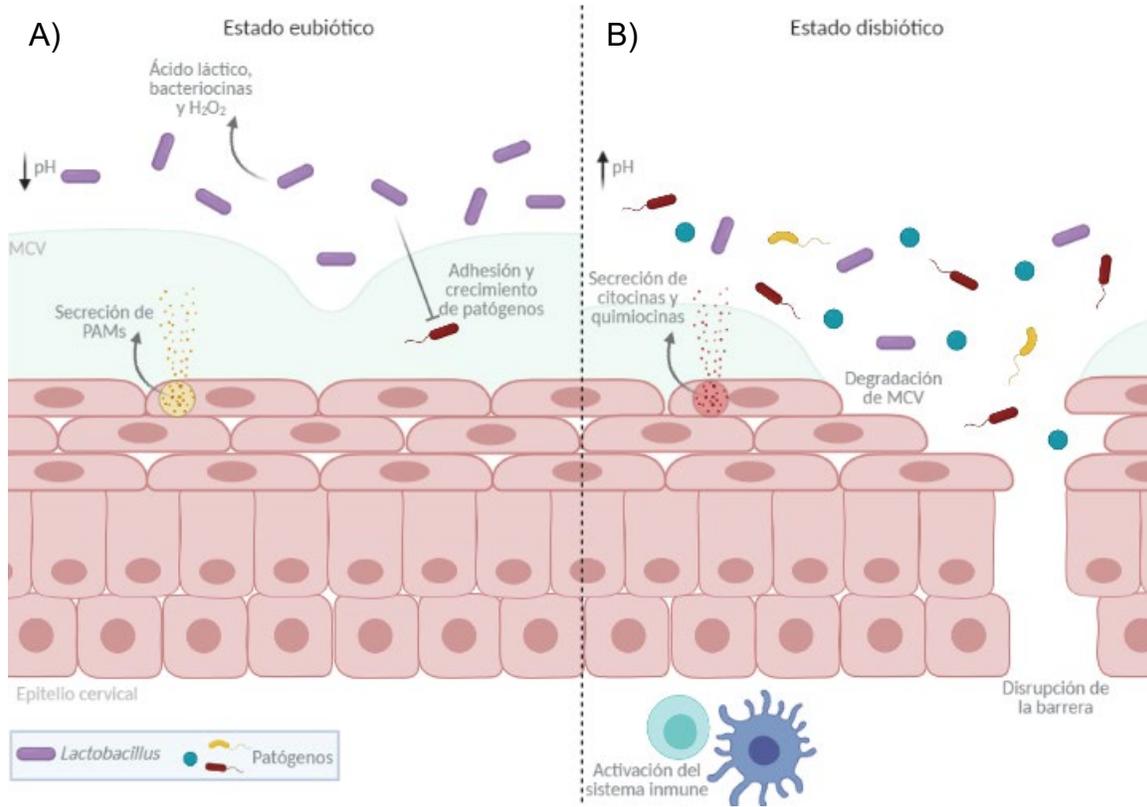


Figura 10. Microbiota vaginal. A) En un estado eubiótico, la microbiota vaginal es dominada por *Lactobacillus* que producen ácido láctico y bacteriocinas lo cual disminuye el pH local y previene la colonización por especies patógenas. De igual forma, bloquea el crecimiento y adhesión de patógenos al MCV y activa la secreción de péptidos antimicrobianos (PAMs) por parte de las células epiteliales. B) En un estado disbiótico, hay una colonización por especies anaerobias facultativas la cual reemplaza a los *Lactobacillus*. Las bacterias patógenas producen enzimas que contribuyen a la degradación del MCV y pueden causar una disrupción de la barrera epitelial. Las células epiteliales liberan citocinas y quimiocinas que activan al sistema inmune y pueden causar inflamación. Figura realizada en Biorender.

La composición de la microbiota depende de diversos factores. Dentro de los factores no modificables se encuentran la etnicidad y la edad. En ese sentido, varios estudios han observado que las poblaciones asiáticas y europeas tienen una mayor predominancia de microbiota *Lactobacillus*-dominante en comparación a las mujeres africanas y latinoamericanas que tienen una mayor diversidad microbiana (Gupta, V. K. *et al.*, 2017). Por otro lado, los cambios en la microbiota vaginal a través de la vida de la mujer han sido ampliamente estudiados; durante la niñez, el

microambiente vaginal tiene un pH alcalino y la microbiota se compone principalmente por bacterias anaerobias Grampositivas y Gramnegativas. Posteriormente, en la pubertad hay un aumento en el nivel de estrógenos, lo cual causa una maduración del epitelio vaginal y acumulación de glucógeno que a su vez promueve la colonización por *Lactobacillus*. Finalmente, durante la menopausia, debido a la reducción en los niveles de estrógeno comienza a disminuir la microbiota dominada por *Lactobacillus* (Leyva-Gomez, G. *et al.*, 2019).

Por otro lado, dentro de los factores modificables que están asociados a un cambio de una microbiota vaginal dominada por *Lactobacillus* a una microbiota diversa, se encuentran el tabaquismo y el uso de anticonceptivos hormonales. Además, se ha observado un aumento en el riesgo de BV al realizar lavados vaginales (Mitra, A. *et al.*, 2016).

La BV es una disbiosis que ha sido reconocida como un problema de salud pública debido a su relación con algunas infecciones de transmisión sexual (ITS). Esta disbiosis ha sido asociada a un incremento en el riesgo de adquirir *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalum* (Molenaar, M. C. *et al.*, 2018), *Neisseria gonorrhoeae*, Virus Herpes Simplex (VHS), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Kroon, S. J. *et al.*, 2018) y VPH (Tamarelle, J. *et al.*, 2019). De esta manera, se ha reportado que una mayor diversidad bacteriana está relacionada a la persistencia del VPH, mientras que una microbiota dominada por *Lactobacillus* está asociada a la eliminación de la infección (Di Paola, M. *et al.*, 2017).

De igual forma, la disbiosis favorece la activación de vías de señalización que se han asociado al aumento de la producción de citocinas proinflamatorias que participan en la infección viral productiva y en la progresión de la enfermedad. Es por esto que, se ha sugerido una asociación entre el nivel de inflamación causado por la BV y la presencia de lesiones cervicales de alto grado (Boccardo, E. *et al.*, 2010). También se ha observado que algunos metabolitos derivados de las bacterias anaerobias como el amoníaco y el nitrito de amonio, pueden causar cambios en las células del epitelio cervical como exfoliación o transformación celular (Liang, Y. *et al.*, 2019).

En conjunto todos estos factores forman un eje de interacción, en el que una modificación en alguno de los componentes (microbiota-inflamación-VPH) puede producir una alteración directa sobre la integridad y homeostasis del epitelio cervical, predisponiéndolo al desarrollo de una lesión o una neoplasia (Ilhan, Z. E. *et al.*, 2019; Caselli, E. *et al.*, 2020).

2. Antecedentes

2.1 Eversión glandular y VPH

La eversión glandular es un proceso fisiológico relacionado con la exposición a niveles elevados de estrógeno como sucede durante la pubertad, el embarazo o por el uso de anticonceptivos hormonales. Las mujeres con eversión glandular reciben tratamiento ablativo cuando presentan condiciones específicas por ejemplo molestias como flujo abundante, sangrado intermenstrual, sangrado postcoital, dolor pélvico y cervicitis recurrente (Machado Junior, L. C. *et al.*, 2008).

La eversión glandular ha sido reconocida como un factor de riesgo para adquirir infecciones de transmisión sexual (ITS) como *Chlamydia trachomatis*, VIH y VPH (Soares, L. *et al.*, 2019). Uno de los primeros trabajos que relaciona a la eversión glandular con la infección por VPH fue publicado por Toon y colaboradores en 1986; en él se estudió a un grupo de mujeres con citología normal y mujeres con cambios inflamatorios no específicos. En ambos grupos se encontraron mujeres con eversión glandular y se observó que el 29% de ellas eran positivas para VPH (Toon, P. G. *et al.*, 1986).

En 2004, nuestro grupo de trabajo realizó un estudio para evaluar la prevalencia de VPH en el tejido glandular de la ectopia cervical con especial interés en VPH 16, ya que éste es el tipo viral más común asociado a CaCU. Se encontró que la prevalencia de VPH en mujeres con eversión glandular era 1.8 veces mayor que en las mujeres sin ectopia cervical, siendo el subtipo más frecuente el VPH 16 en el grupo con eversión glandular (Rocha-Zavaleta, L. *et al.*, 2004).

En otro trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, se evaluó la presencia de distintos genotipos de VPH en pacientes con eversión glandular, citología normal y LSIL (Monroy Lagos, O. *et al.*, 2010). En éste se encontró una infección por VPH en el 74% de las mujeres con eversión glandular mientras que sólo el 30% de las mujeres con citología normal tenían una infección por este virus. Posteriormente, se evaluó si existía una infección productiva del VPH presente en las biopsias del tejido evertido, sin evidenciar el transcrito de E6*I ni presencia de marcadores de proliferación como p16^{INK4a} o ki67 (Cortez Hernandez, F. J. 2020). Con esto se

concluyó que, a pesar de haber VPH en la eversión glandular, la infección no es productiva en este epitelio.

De acuerdo a los reportes previamente mencionados, la prevalencia del VPH en mujeres con eversión glandular es mayor que en aquellas que no la presentan. Sin embargo, el papel de la infección viral en el epitelio glandular y la presencia de VPH en el moco cérvico-vaginal no han sido comprendidos por completo.

2.2 VPH, microbiota e inflamación

La infección persistente por VPH ha sido asociada al desarrollo de lesiones y neoplasias debido a que este virus se encuentra en el 99% de las lesiones y tumores (Walboomers, J. M. M. *et al.*, 1999). En este sentido, en los últimos años se han descrito algunos factores que promueven persistencia de la infección por este virus como la inflamación crónica y cambios en la composición de la microbiota vaginal (Mittra, A. *et al.*, 2016).

En cuanto a la inflamación, se ha visto que las ITS pueden inducir una respuesta inmune exacerbada con la finalidad de eliminar al patógeno y proteger contra la recurrencia de la infección. Referente a esto, algunos trabajos han asociado la eliminación del VPH del tracto genital con una respuesta proinflamatoria T_h1 (Shannon, B. *et al.*, 2017). Sin embargo, si la infección por VPH no es eliminada por el sistema inmune, ésta promueve una inflamación crónica que puede causar daño *in situ* y facilitar el desarrollo de tumores (Castro-Sobrinho, J. M. *et al.*, 2015). En este sentido, Tjong *et al* en 1999 reportó una asociación entre cervicitis y HSIL en mujeres con infección por VPH de alto riesgo. Adicionalmente, encontró un aumento en IL-6 e IL-8 en las lesiones asociadas a este virus y CaCU. En otro trabajo se describió un aumento en IL-1 β , IL-8 y MIP-1 β en MCV de mujeres con HSIL comparado con aquellas con LSIL (Iwata, T. *et al.*, 2015).

Asimismo, se ha propuesto que la repuesta T_h2 tiene un papel importante en el desarrollo de CaCU. Esto se debe a que conforme progresan las lesiones cervicales, se observa un incremento de IL-10 (Ali, K. S. *et al.*, 2012) e IL-4 (Bhairavabhotla, R. K. *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha observado un aumento de

IL-6 en lesiones de alto grado (HSIL) por lo cual, Li y colaboradores propusieron que la cantidad de IL-6 se puede utilizar como un marcador para predecir el riesgo de la progresión de la lesión.

Por otro lado, los cambios en la composición de la microbiota vaginal también han sido asociados a la infección por VPH, la persistencia de la infección y a la carcinogénesis mediada por este virus. Una serie de trabajos ha considerado a la microbiota dominada por *Lactobacillus* como un factor protector contra el VPH, mientras que una microbiota con menor proporción de especies de *Lactobacillus* ha sido fuertemente relacionada a la infección por este papilomavirus. En este sentido, una disbiosis vaginal o una microbiota asociada a BV aumentan la incidencia y prevalencia del VPH (Watts, D. H. *et al.*, 2005; Di Paola, M. *et al.*, 2017).

La microbiota de mujeres con VPH es clasificada generalmente como CST-IV, el cual está caracterizado por el aumento en la abundancia relativa de bacterias anaerobias facultativas (Ravel, J. *et al.*, 2011). Algunas de las bacterias asociadas a esta ITS son el filo *Fusobacteria* (Brotman, R. *et al.*, 2014) y los géneros *Sneathia*, *Megasphaera* y *Pseudomonas* (Audirac-Chalifour, A. *et al.*, 2016).

En un estudio realizado en Shanghai — donde los VPH oncogénicos con mayor incidencia son el VPH 16, 52 y 58 — se observó por LEfSe (Linear discriminant analysis effect size) que distintas bacterias están asociadas a la infección por estos tipos virales. Es decir, una microbiota con *Coriobacteriales*, *Actinobacteria* y *Atopobiaceae* está asociada a VPH 16, mientras que la presencia de *Bacillus* y *Vibrionaceae* está relacionada a VPH 52 y una microbiota dominada por *Ruminiclostridium*, *Aurantimonadaceae* y *Aureimonas* está vinculada a VPH 58 (Huang, X. *et al.*, 2018).

En cuanto a la eliminación del virus, se ha reportado una mayor velocidad de eliminación en mujeres con microbiota dominante en *Lactobacillus* en específico de *L. gasseri* (CST II) en una cohorte seguida por 16 semanas (Brotman, R. *et al.*, 2014). Mientras que una eliminación más lenta o persistencia por más de un año ha sido asociada a la presencia de *Gardnerella*, *Prevotella*, *Megasphaera* y *Atopobium* (Di Paola, M. *et al.*, 2017).

En otro trabajo, se asoció a una microbiota dominada por *Lactobacillus* a la regresión de la neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 (NIC2), mientras que la depleción de estas bacterias y presencia de *Megasphaera*, *Prevotella* y *Gardnerella* fue asociado a la persistencia de NIC2 o a una regresión lenta de la lesión (Mitra, A. *et al.*, 2020).

Finalmente, la comunicación constante entre el microbioma y el sistema inmune es esencial para que el microambiente vaginal se mantenga regulado, ya que al modificarse alguno de los componentes el otro también se modifica (Torcia M. G. 2019). En este sentido, Anahtar *et al.* en 2015 plantean que existe una relación entre comunidades bacterianas con gran diversidad y el nivel de citocinas proinflamatorias. En ese trabajo se propone que las células presentadoras de antígenos que se encuentran en el canal cervical son capaces de reconocer el LPS de algunas especies bacterianas y producir una respuesta inflamatoria mediante la generación de citocinas proinflamatorias y quimioatrayentes de linfocitos T. Además, se ha reportado que el microambiente vaginal se puede modificar a nivel metabólico por la presencia de VPH (Ilhan, Z. *et al.*, 2019).

Con todos estos antecedentes se evidencia la compleja relación que existe entre el sistema inmune del hospedero y el microbioma vaginal, y el papel que estos tienen en el desarrollo de lesiones asociadas a una infección por VPH y su progresión a neoplasias.

3. Planteamiento del problema

El cáncer cervicouterino representa un gran problema de salud ya que es la segunda neoplasia con mayor incidencia y número de muertes en México. En los últimos años, dentro de este tipo de cáncer se ha registrado un aumento en la incidencia de adenocarcinoma de cérvix. Lo anterior se puede deber a que su detección temprana es compleja por la inaccesibilidad del endocérvix. En este sentido, la eversión glandular nos permite estudiar este epitelio, ya que el tejido protruye hacia la cavidad vaginal conservando su estructura y morfología.

Algunos trabajos previos han demostrado que las mujeres con eversión glandular tienen un mayor riesgo de adquirir una infección por VPH. A pesar de eso, el papel del VPH en la transformación del epitelio no ha sido dilucidado ya que las células que lo conforman son clasificadas como no permisivas y por lo tanto, no permiten que el virus lleve a cabo su ciclo de vida. Por esta razón, se sugiere que la transformación del epitelio glandular se da por un mecanismo distinto al que se ha descrito en el epitelio escamoso estratificado.

Adicionalmente, la infección persistente por el VPH ha sido asociada a inflamación crónica y disbiosis vaginal, lo cual daña el ectocervix y permite la progresión a lesiones neoplásicas.

Por esta razón, el estudio de los cambios en la composición de la microbiota y en el microambiente inflamatorio en el MCV, en presencia del VPH, es importante para comprender mejor su papel en la transformación del endocérvix.

4. Hipótesis

La presencia del VPH en el moco cérvico-vaginal en mujeres con eversión glandular está asociada a cambios en a la microbiota vaginal y en el microambiente inflamatorio.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la relación entre la infección por VPH, los cambios la diversidad bacteriana y en la expresión de marcadores inflamatorios en el moco cérvico-vaginal de pacientes con eversión glandular.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar la presencia del Virus del Papiloma Humano en moco cérvico-vaginal de pacientes con eversión glandular.
- Evaluar el microbioma presente en el moco cérvico-vaginal de pacientes con eversión glandular.
- Evaluar el perfil de citocinas y quimiocinas en moco cérvico-vaginal de pacientes con eversión glandular.

6. Materiales y métodos

6.1 Obtención de muestras

La población de estudio fue seleccionada de mujeres atendidas en la Clínica de Displasias del Colegio Mexicano de Colposcopistas: “Fundación Cruz-Talonia” ubicada en la Ciudad de México. En el estudio transversal participaron 201 mujeres las cuales fueron informadas del propósito del estudio, firmaron un consentimiento (Anexo 1) para formar parte de éste y se les realizó un cuestionario para evaluar los factores de riesgo de desarrollo de cáncer cervicouterino asociado a la infección por VPH (Figura 11).

Fecha de registro:_____	No. de expediente:_____	No. de paciente:_____
Nombre:_____	Edad:_____	
Estado civil:_____	Ocupación:_____	
Edad de menarca:_____	Edad de primera relación sexual:_____	
No. de parejas sexuales:_____	No. de embarazos:_____	
Método anticonceptivo:_____	Tiempo de uso:_____	
Enfermedades autoinmunes:_____	Enfermedades crónicas:_____	
Infección por VIH?:_____	Vacuna contra VPH?:_____	
Papanicolau?:_____	Fecha/Diagnóstico:_____	
Prueba de VPH?:_____	Fecha/Resultado:_____	
Consumo de cigarro:_____	Desde hace cuánto tiempo?_____	Cigarros al día:_____

Figura 11. Cuestionario para evaluar factores de riesgo de desarrollo de CaCU asociado a infección por VPH.

Los criterios de inclusión para el estudio fueron:

- * Firmar un consentimiento informado
- * Ser mayor de edad
- * No estar embarazada
- * No tener historial de infección por VPH o lesiones relacionadas con VPH
- * No tener reporte de VIH
- * Tener un diagnóstico colposcópico e histopatológico de eversión glandular

A las mujeres con diagnóstico colposcópico e histopatológico de eversión glandular se les realizó un lavado del endocérvix con PBS (Anexo 2) para recolectar el moco

cérvico-vaginal (MCV). Posteriormente, se tomó una biopsia dirigida colposcópicamente del tejido evertido. Ambas muestras se guardaron en tubos estériles a -20°C para su posterior análisis (Figura 12).

Para evaluar la presencia de VPH en las biopsias de tejido evertido y llevar a cabo su genotipificación, se extrajo el DNA utilizando el QIAamp DNA Kit (Qiagen, Hilden, Alemania. Cat. 51304) siguiendo las instrucciones del proveedor y posteriormente se realizó un ensayo multiplex de genotipificación tipo-específica (TS-MPG: Type-specific multiplex genotyping) en el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC), Lyon, Francia como se describió previamente (Clifford *et al.*, 2016). Con esos resultados se dividieron las muestras en los grupos VPH+ (n=91) y VPH- (n=71) (Figura 12). El procesamiento de las muestras de MCV se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM tal y como se describe en la sección correspondiente.

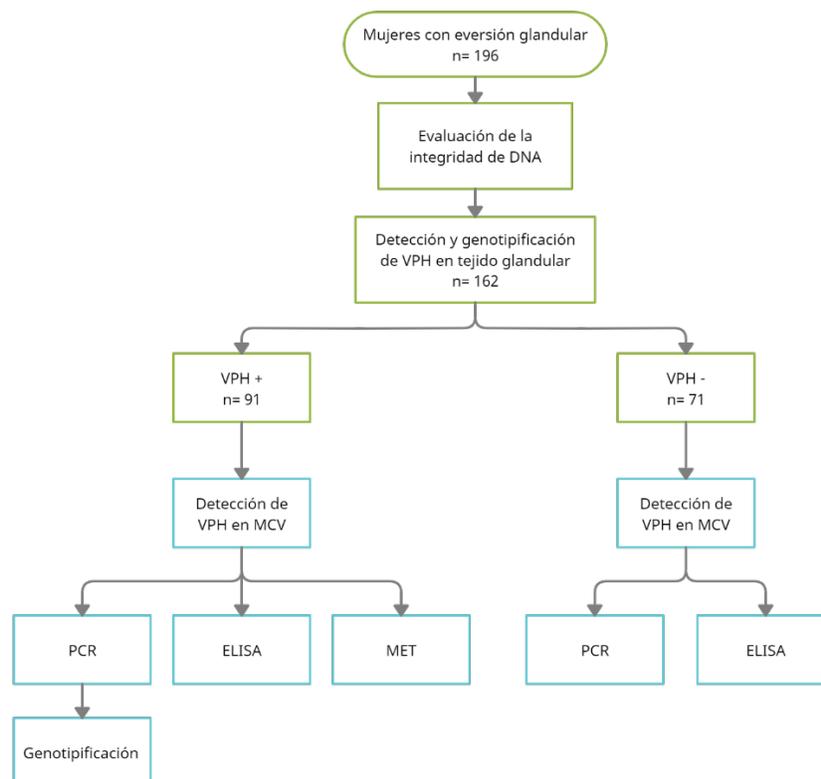


Figura 12. Esquema de trabajo para la detección del VPH. En verde se encuentra el trabajo previo realizado por Cortez, F. en el que se determinó si las pacientes eran positivas a VPH en tejido glandular; tras hacer la división entre VPH + y VPH -, se buscó detectar al VPH en MCV mediante PCR, ELISA y Microscopía electrónica de transmisión (MET). Lo presentado en este trabajo se muestra en azul.

6.2 Detección del VPH en moco cérvico-vaginal

Extracción de DNA y PCR

El DNA de las muestras de MCV se obtuvo utilizando QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen. Cat. 51104) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para evaluar la integridad del DNA, se amplificó el gen β -globina (Tabla 1) y las muestras positivas para este gen se utilizaron para buscar el DNA viral. Para la detección del VPH se utilizaron dos juegos de oligos que reconocen el gen L1 del virus (Tabla 1).

Gen	Oligonucleótido		Secuencia	Tamaño
β-globina	S	PC03	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	268 pb
	A	PC04	5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'	
L1	S	MY09	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	450 pb
	A	MY11	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'	
L1	S	L1C1	5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTTT-3'	250 pb
	A	L1C2	5'-TACCCTAAATACTCTGTATTG-3'	
HPV 16 E7	S	Pr3	5'-GTCAAAGCCACTGTGTCCT-3'	499 pb
	A	Pr4	5'-CCATCCATTACATCCCGTAC-3'	
HPV 18 E6	S	E6-HPV18L	5'-GCTTTGAGGATCCAACACGG-3'	182 pb
	A	E6-HPV18R	5'-AGCATGCGGTATACTGTCTCT-3'	
HPV 31 E2	S	HPV31F	5'-ATGGTGATGTACACAACACC-3'	514 pb
	A	HPV31R	5'-GTAGTTGCAGGACAACTGAC-3'	

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de VPH en moco cérvico-vaginal por PCR. Oligonucleótidos sentido (S) y antisentido (A).

Para estas reacciones se utilizó amortiguador de carga (5x Green GoTaq Flexi Buffer, Promega, Madison, EUA. Cat. M8911), 2 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 μ M de cada oligo (T4 OLIGO, Irapuato, México), 1 U de Taq Polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega. Cat. M7801), 20-50 ng de DNA extraído del MCV y agua estéril libre de nucleasas para llevar la reacción a 20 μ l. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (T-100, Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) y se utilizaron los programas de amplificación descritos en la Tabla 2.

Gen	Inicio	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Final
β-globina	94°C	38 ciclos			72°C
	10 min	94°C 40 s	55°C 40 s	72°C 50 s	7 min
L1 (MY)	94°C	38 ciclos			72°C
	10 min	94°C 40 s	49°C 40 s	72°C 55 s	7 min
L1 (L1)	94°C	38 ciclos			72°C
	10 min	94°C 40 s	55°C 40 s	72°C 55 s	10 min
E7 VPH 16	95°C	38 ciclos			72°C
	5 min	94°C 30 s	54°C 60 s	72°C 90 s	10 min
E6 VPH 18	95°C	35 ciclos			72°C
	5 min	95°C 30 s	54°C 60 s	72°C 90 s	10 min
E2 VPH 31	94°C	40 ciclos			72°C
	5 min	95°C 60 s	55°C 60 s	72°C 60 s	10 min

Tabla 2. Programa de PCR para la detección de VPH en moco cérvico-vaginal.

Por otro lado, el genotipo del VPH se determinó utilizando oligos específicos para VPH 16, VPH 18 y VPH 31 (Tabla 1). Las reacciones para amplificar el gen E7 de VPH 16 y el gen E6 de VPH 18 se prepararon replicando las condiciones mencionadas anteriormente y para amplificar el gen E2 de VPH 31 se utilizaron las condiciones reportadas por Shikova en 2009. Los controles positivos fueron, DNA de células SiHa para VPH 16, DNA de células HeLa para VPH 18 y DNA obtenido de una biopsia positiva a VPH 31 para este tipo viral. Los programas de amplificación utilizados se especifican en la Tabla 2.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Para esto, se disolvió agarosa (Invitrogen, Carlsbad, EUA. Cat. 16500500) en TBE 1x (Anexo 2) con Bromuro de etidio y se dejó gelificar. En el primer carril se agregaron 5 µl de marcador de peso molecular (TrackKit 100bp DNA ladder, Invitrogen. Cat. 10488058) y en el resto de los carriles se colocaron 10 µl del producto de PCR. Posteriormente, el gel se corrió durante 30 minutos a 100 Volts en TBE 1x. Se observó la presencia de las bandas en el peso correspondiente utilizando un foto documentador.

Microscopía electrónica

La presencia de partículas virales de VPH en el MCV también se evaluó por microscopía electrónica de transmisión, utilizando 500 µl de MCV de cada muestra analizada. Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm durante cinco minutos y la pastilla se lavó con PBS y se fijó (glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído 2.5%) por una hora. Posteriormente, se lavó con PBS y se le agregó tetróxido de osmio por una hora y media. Después, se realizó otro lavado y se deshidrató con 50%, 70%, 80%, 90% y 100% de etanol durante 15 minutos. Al finalizar la deshidratación, se le adicionó óxido de propileno por 15 minutos seguido de mezclas 2:1, 1:1 y 1:2 de óxido de propileno resina epóxica EPON 812 durante hora y media cada una. Tras las incubaciones, se centrifugó la muestra, se le adicionó resina y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se le adicionó resina y se dejó polimerizar a 60°C toda la noche. Finalmente, se realizaron cortes semifinos (240 nm) para observar en el microscopio de campo claro y cortes ultrafinos (70 nm) para observar en el microscopio electrónico. Se le agregó Uranilo alcohólico y plomo a los cortes ultrafinos y éstos se observaron en el microscopio JEM 1010 (JEOL, Peabody, EUA) en el Laboratorio de Microscopía del Instituto Nacional de Cancerología.

Detección de partículas virales por ELISA

Para la detección del VPH por ELISA, primero se sembraron células HaCaT en placas de 96 pozos con medio RPMI 1640 (Biowest, Riverside, EUA. Cat. L0500) con 10% de suero fetal bovino (Biowest. Cat. S1810) y 1% de penicilina/estreptomicina (Anti-Anti 100X, Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA. Cat. 15240062). Al transcurrir 48 horas, las células se removieron utilizando EDTA 0.5M para conservar solamente la matriz extracelular (MEC). Por otro lado, se tomaron 300 µl de MCV y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se retiraron 200 µl y la pastilla se resuspendió en los 100 µl restantes. A cada pozo se le agregaron 100 µl de MCV o 1000 ng de Gardasil (Merck & Co., Kenilworth, EUA.) como control positivo, diluido en PBS y se incubaron durante una hora a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron y se bloquearon con TBS-Tween 0.1%-BSA 2% (Anexo 2) durante 1 hora a 37°C. Tras realizar un lavado, las placas se

incubaron durante 2 horas a 37°C con 100 µl HPV Cocktail Broad Spectrum (1:100) (Biocare Medical, Pacheco, EUA. Cat. 177). Después, se realizaron cuatro lavados con TBS-Tween y se hizo una incubación con Polyclonal Goat anti-mouse immunoglobulins-AP (1:500) (DakoCytomation, Santa Clara, EUA. D0486) durante 1 hora y media a 37°C. Finalmente, se diluyó el sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich St. Louis, EUA. Cat. S0942-50TAB) en Dietenolamina al 10% (Sigma-Aldrich. Cat. D8885) y se le agregaron 100 µl de la solución a cada pozo. La absorbancia se leyó a 405 nm en un lector de placas de ELISA (ELx800, BioTek, Winooski, EUA). El ensayo se realizó por duplicado; el valor final fue calculado restándole el valor del blanco al promedio de los duplicados. El valor de detección fue estimado utilizando la distribución de la absorbancia de las muestras VPH negativas y se definió como la absorbancia media + la desviación estándar.

6.3 Evaluación de microbiota presente en moco cérvico-vaginal

Secuenciación

La evaluación de la microbiota presente en el MCV se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas del Instituto de Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Previo a la extracción de DNA, 63 muestras de MCV fueron centrifugadas durante 5 minutos a 14,000 x g para separar la fracción soluble de la celular. Una vez que se separaron 500 µl de la fracción soluble, se realizó la extracción con el PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific. Cat. A29789) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posterior a la extracción, se determinó la cantidad de DNA utilizando el equipo NanoDrop (ThermoFisher Scientific. Cat. 13-400-518).

Consecutivamente, se realizó una PCR para amplificar la secuencia V4 del gen 16S utilizando oligos con secuencias adaptadoras (515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), Caporaso *et al.*, 2011)). Para la reacción se utilizó amortiguador de corrida, 2 mM de MgCl₂, 0.3 mM de dNTPs, 1 µM de cada oligonucleótido, 0.675 U de Taq polimerasa, 5-20 ng de DNA y agua estéril y libre de nucleasas para llevar la

reacción a un volumen final de 25 μ l. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, ThermoFisher Scientific. Cat. 4375786) y el protocolo de PCR fue: 93°C por 5 minutos, 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos seguido de 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2%.

Posteriormente, el producto de PCR fue purificado utilizando perlas AMPure XP (Beckman Dickson, Atlanta, EUA. Cat. A63881) siguiendo las instrucciones del proveedor. Después de la purificación, se agregaron los índices y adaptadores de secuenciación Illumina a cada producto de PCR para generar la biblioteca. Esto se realizó utilizando el Nextera XT Index Kit (Illumina, San Diego, EUA. Cat. 15052163) y para cada reacción se utilizaron las condiciones mencionadas anteriormente, cambiando 5 μ l de cada índice en lugar de los oligos, 5 μ l del producto de PCR y agua estéril y libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen final de 50 μ l. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, ThermoFisher Scientific. Cat. 4375786) y el protocolo de PCR fue el ya mencionado anteriormente modificando el número de ciclos a 8. Tras la PCR, los productos se purificaron dos veces utilizando perlas AMPure XP (Beckman Dickson. Cat. A63881) y su concentración fue determinada usando el Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific. Cat. Q32851).

Finalmente, se hicieron los cálculos y diluciones para generar una biblioteca de 4nM. Posteriormente, se calculó la molaridad total de la biblioteca utilizando el Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA. Cat. DE04105609) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para llevar a cabo la secuenciación, se desnaturalizó el DNA con NaOH 0.2N y se preparó el control interno (PhiX) (Illumina. Cat. 15017666). Finalmente, la biblioteca se secuenció en la plataforma Illumina MiSeq™ a una concentración final de 8 pM con 25% de PhiX para generar lecturas pareadas de 500 bases de longitud (v2 2 x 250 ciclos). En total, se generaron 13,115,362 secuencias durante la corrida (203,982 secuencias en promedio por muestra).

Análisis de la secuenciación

Las secuencias crudas obtenidas del Illumina MiSeq™ fueron procesadas utilizando QIIME 2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology, versión 2019.4) como descrito previamente por Boylean *et al.*, 2019. Primero, las secuencias que pudieron surgir a partir de errores de secuenciación y las quimeras fueron eliminadas, además se realizó una rarefacción a una profundidad de 65,000 secuencias por muestra. Posteriormente, se generó una tabla de variantes de secuencia de amplicón (ASV) utilizando dada2 (trim-left-f 19, trim-left-r 20, trunc-left-f 180, trunc-left-f 185) con lo cual se identificó un total de 467 ASVs con una mediana de 177,565 secuencias. La taxonomía fue asignada a las ASVs utilizando el script q2-feature-classifier con un porcentaje de similitud del 99% con la base de datos GreenGenes (versión 13_8). De igual forma se repitió este análisis comparando con la base de datos SILVA (versión 132) ya que ésta se encuentra más actualizada. El árbol filogenético se construyó utilizando el script q2-phylogeny.

Los índices de diversidad alfa (Shannon y Observed) fueron calculados con el programa Vegan (versión 2.5.6) utilizando la tabla de ASV. Por otro lado, la diversidad beta fue evaluada por Análisis de Componentes Principales (PCoA) (Bray-Curtis, UniFrac ponderado y no ponderado) y la diferencia fue evaluada mediante un análisis de varianza permutacional multivariado (PERMANOVA). Finalmente, para detectar taxa diferencialmente abundante entre grupos, se utilizó el análisis LEfSe (Linear discriminant analysis effect size). Para evaluar las correlaciones se utilizó un análisis de correlación de Spearman, tomando solamente los datos con $p < 0.05$ como significativos.

6.4 Cuantificación de citocinas en moco cérvico-vaginal

Evaluación de IL-18 por ELISA

Previo al ensayo, 20 muestras de MCV de cada grupo (VPH + y VPH -) se centrifugaron a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, la cantidad total de proteína fue cuantificada utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories. Cat. 5000112). La concentración total de proteína fue estimada usando una curva estándar de 0 a 2000 µg/ml y se hicieron

diluciones para tener 250 µg/ml de proteína en cada muestra. Para cuantificar la cantidad de IL-18 se utilizó un kit de ELISA (CUSABIO, Houston, EUA. Cat. CBS-E07450h) y se siguieron las instrucciones del fabricante. La lectura se hizo a 450nm y 540nm usando un lector de placas de ELISA (Synergy H1, BioTek).

Citometría de flujo

Para la evaluación del perfil Th1/Th2 y el perfil proinflamatorio en muestras de MCV se utilizaron los kits BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD, Franklin Lakes, EUA. Cat. 551809) y BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (BD. Cat. 551811) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de las muestras se hizo en el Citómetro de Flujo FACSCanto II (BD) del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Por otro lado, el panel de 13 citocinas y 13 quimiocinas en muestras de MCV se midió utilizando los kits LEGENDplex™ Human Th Panel (BioLegend, San Diego, EUA. Cat. 740001) y LEGENDplex™ Human Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend. Cat. 740003) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de las muestras se hizo en el Citómetro de Flujo FACSAria III (BD) del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa LEGENDplex v8.0 (BioLegend). Se normalizaron los resultados haciendo una corrección por proteína como propuesto por Marks *et al.* en 2012. Finalmente, la normalización de las citocinas para el mapa de calor se realizó como propuesto por Anahtar, M. N *et al.* en 2015.

6.5 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Prisma 8 (GraphPad, EUA). Todos los datos se presentan como media ± error estándar (SEM) y en todos los casos se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Para analizar las características de la población de estudio, se realizó una t de student para comparar ambos grupos (VPH + vs. VPH-). En el caso de los anticonceptivos utilizados, se utilizó una prueba de Fishers para comparar los dos grupos. Por otro lado, para la citometría, se utilizó el Mann-Whitney U Test para grupos de dos (no hay

distribución normal: D'Agostino & Pearson normality test), Kruskal-Wallis test ANOVA de 1 vía para comparar entre virus (no hay distribución normal) y ANOVA de dos vías para comparar por edades. El análisis estadístico de la microbiota se realizó como mencionado en la sección 6.3.

7. Resultados

7.1 Población de estudio

En este estudio se incluyeron 162 muestras de mujeres diagnosticadas con eversión glandular de la Clínica de Displasias del Colegio Mexicano de Colposcopistas “Fundación Cruz-Talonia”, a quienes se les aplicó un cuestionario para evaluar los factores de riesgo de la infección por VPH. A continuación, se realizó la detección y genotipificación del VPH mediante TS-MPG en las biopsias; obteniendo 91 muestras positivas (56%) y 71 muestras negativas (44%) al DNA viral. El estudio de los subtipos virales presentes en estas muestras demostró que 85% corresponde a VPH de alto riesgo y que los genotipos con mayor prevalencia son VPH 16, VPH 31 y VPH 18 representando el 24.5%, 14.3% y 12.2% respectivamente. (Cortez Hernández, F. J. 2020).

<u>Característica</u>	VPH + (n=91)	VPH – (n=71)	valor de <i>p</i>
Edad (Rango)	31.03 (20-54)	32.75 (20-50)	0.163 ^a
Menarca	12.56	12.31	0.364 ^a
IVSA	17.76	18.08	0.498 ^a
No. parejas sexuales	2.24	1.82	0.037^a
No. embarazos	2.15	2.07	0.708 ^a
Método anticonceptivo	VPH + (n=91)	VPH – (n=71)	<i>p</i> valor
Hormonal	36.3%	36.6%	>0.999 ^b
Barrera	19.7%	15.5%	0.539 ^b
Cirugía	15.5%	11.3%	0.495 ^b
Ninguno	28.5%	36.6%	0.311 ^b

Tabla 3. Características de la población de estudio. Se muestran los resultados del análisis de las características de la población de estudio. Cada valor es mostrado como la media de cada grupo. La diferencia entre ambos grupos se evaluó utilizando una prueba de T^a y una prueba de Fisher^b considerando significativo un valor $p < 0.05$.

Con la información obtenida del cuestionario realizado a las pacientes y los resultados de la genotipificación, se generó una tabla comparativa con las características de la población para indagar una posible relación entre el predominio de alguna éstas y la presencia del VPH (Tabla 3). En ella se muestra que hay una diferencia significativa ($p=0.037$) en el número de parejas sexuales que han tenido

las mujeres con infección por VPH (2.24) y las mujeres sin infección por VPH (1.82). Por el contrario, en el caso de los métodos anticonceptivos utilizados, no se observó diferencia significativa entre ambos grupos.

7.2 Detección del VPH en moco cérvico-vaginal

Por otro lado, en trabajos previos del laboratorio se demostró que la infección por VPH también ocurre en el tejido glandular cervical (Monroy Lagos, O. 2017; Cortez Hernández, F. J. 2020). Dado que el papel principal de las células columnares del epitelio glandular es la secreción de MCV se decidió explorar la posibilidad de que el MCV de pacientes con eversión glandular infectadas por VPH tuviera partículas virales.

Para cumplir el primer objetivo del proyecto, se realizó la detección del VPH en MCV mediante PCR, ELISA y MET, para validar los hallazgos previamente obtenidos en las biopsias.

PCR

Previo a la detección del VPH en el MCV, se realizó una primera PCR para evaluar la integridad del DNA extraído. Para esto se amplificó un fragmento de 268pb del gen β -globina en 40 muestras de MCV distribuidas en 2 grupos: 33 VPH+ y 7 VPH-. Aquellas muestras donde no se observó la banda de β -globina fueron descartadas. Por lo tanto únicamente se evaluó la presencia del virus en 33 muestras de MCV distribuidas en 2 grupos: 27 muestras VPH+ y 6 muestras VPH-.

En primer lugar se realizó la amplificación de un fragmento de la región L1 del genoma viral, con los oligonucleótidos MY09/MY11, encontrando una banda de 450pb en 6 de las muestras VPH+ evaluadas (22%). Debido a la baja eficiencia obtenida al utilizar este juego de oligos, se decidió verificar la presencia del virus con los oligos universales L1C1/L1C2. Con estos se observó una banda de 250pb en 19 de las muestras VPH+ (70.4%). Con ninguno de los juegos de oligos se detectaron falsos positivos.

Debido a que la genotipificación del VPH por PCR no ha sido descrita con anterioridad en MCV, se decidió corroborar mediante PCR si el subtipo viral

identificado en el MCV, correspondía al subtipo detectado en las biopsias de tejido glandular. Para esto se amplificaron genes de la región temprana del genoma viral de los subtipos de VPH relacionados con el desarrollo de CaCU: E7 de VPH 16, E6 de VPH 18 y E2 de VPH 31. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% y algunas fotos representativas de cada PCR se muestran en la Figura 13.

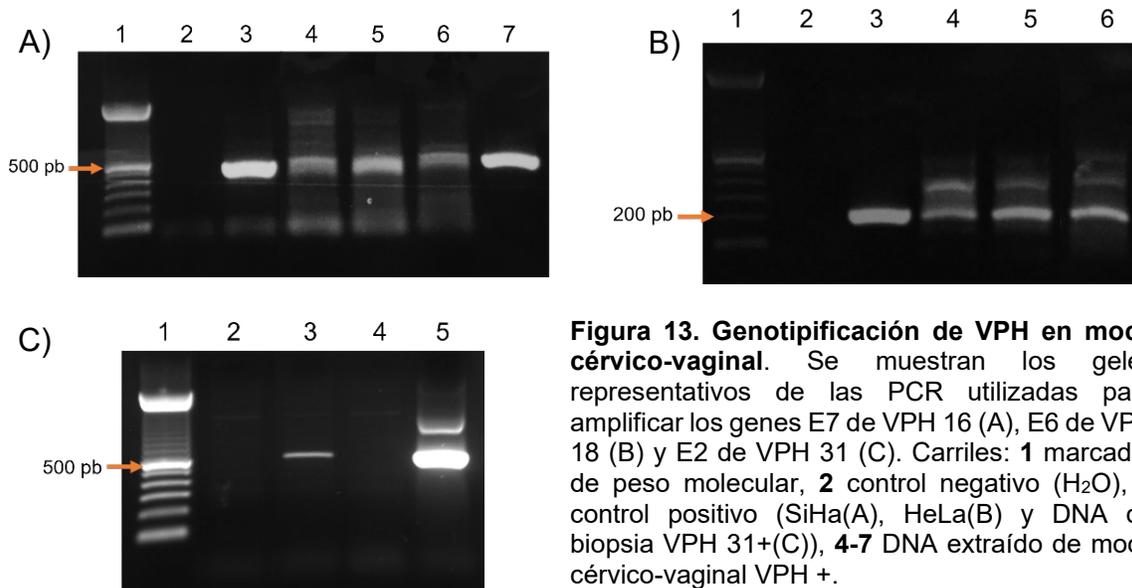


Figura 13. Genotipificación de VPH en moco cérvico-vaginal. Se muestran los geles representativos de las PCR utilizadas para amplificar los genes E7 de VPH 16 (A), E6 de VPH 18 (B) y E2 de VPH 31 (C). Carriles: 1 marcador de peso molecular, 2 control negativo (H₂O), 3 control positivo (SiHa(A), HeLa(B) y DNA de biopsia VPH 31+(C)), 4-7 DNA extraído de moco cérvico-vaginal VPH +.

En la población en general, la prevalencia de VPH16 tiene una mayor proporción que el resto de los demás subtipos virales (Bruni, L. *et al.*, 2010), por lo tanto, en nuestras muestras no hay una distribución homogénea. Con este fin, se evaluaron 13, 5 y 7 muestras que en las biopsias eran positivas para VPH16, VPH18 y VPH 31 respectivamente. En primer lugar, se realizó la amplificación de un fragmento del gen E7 de VPH 16, encontrando una banda de aproximadamente 500pb en 11 de las muestras evaluadas (85%). Por otro lado, se amplificó un fragmento del gen E6 de VPH 18 observando una banda de aproximadamente 180pb en todas las muestras (100%). Finalmente, se realizó la amplificación de un fragmento del gen E2 de VPH 31 encontrando una banda de 514pb en 3 de las muestras evaluadas (43%). Con estos experimentos se puede confirmar que el virus puede ser detectado en el MCV y que además es posible hacer su genotipificación.

ELISA

Para reafirmar la presencia del VPH en las muestras de MCV, se realizó un ELISA empleando la metodología propuesta por Rommel *et al.*, 2005, en la cual se utiliza matriz extracelular (MEC) como medio de adhesión ya que se ha descrito en la literatura que el Heparán Sulfato presente en la MEC sirve como receptor para el VPH (Joyce, J. G. *et al.*, 1999; Giroglou, T. *et al.*, 2001).

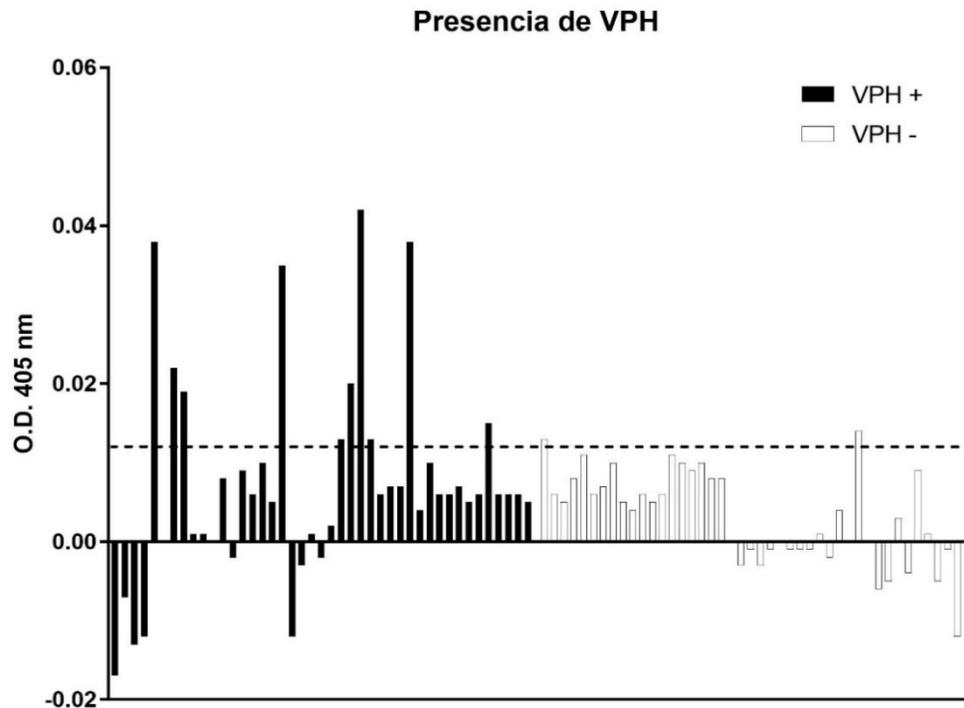


Figura 14. Determinación de presencia de VPH en moco cérvico-vaginal mediante ELISA. Detección del VPH en moco cérvico-vaginal mediante ELISA utilizando MEC para la unión de partículas virales. Se analizaron 43 muestras VPH+ y 43 VPH- (Basado en el resultado de la biopsia). Cada columna representa una muestra de moco cérvico-vaginal. El valor de detección (0.012) se representa con la línea punteada.

Con esta metodología fue posible detectar la presencia del virus en 10 de 43 muestras VPH+ (23.3%) (Figura 14). Asimismo, 2 de 43 muestras VPH- (4.6%) se encontraron en el límite mínimo de detección, las cuales podrían considerarse falsos positivos o muestras con presencia del virus en el MCV sin infección en el tejido. La baja eficiencia en la detección con este método puede deberse a diversos factores, por ejemplo, la cantidad de partículas virales libres en el moco cervicovaginal, o a la especificidad del anticuerpo.

Ya que las muestras de MCV se obtuvieron mediante un lavado del cérvix, se podría especular que la fuente del DNA viral detectado son partículas virales provenientes de células infectadas que resultan del proceso natural de descamación del cérvix. Para descartar que el VPH detectado fuera derivado de células infectadas, se analizaron las muestras mediante microscopía electrónica.

Microscopía electrónica

Finalmente, se decidió confirmar la presencia de partículas virales libres en el MCV mediante microscopía electrónica en 5 muestras seleccionadas aleatoriamente, las cuales fueron positivas a VPH tanto en el tejido de biopsia como en el MCV (detectado por PCR). Mediante esta metodología se observaron partículas virales con una morfología y tamaño similar al reportado para el Virus del Papiloma Humano (55nm).

En la Figura 15 se resaltan con una flecha naranja partículas de 55.1 nm (Figura. 15A) y 57.6 nm (Figura. 15B) las cuales corresponden tanto en morfología como en tamaño, a los parámetros reportados para VPH. Estas partículas provienen del MCV de una paciente VPH 16+. Por otro lado, se muestran partículas virales de 55 nm (Figura. 15C) y 52.1 nm (Figura. 15D) provenientes del MCV de una paciente con VPH 31. En ambos casos se observan partículas fuera de células y rodeadas de fibras de mucina lo cual nos indica que son partículas virales libres. De igual forma, se observan otras partículas de mayor tamaño, las cuales fueron descartadas como VPH.

Por otro lado, dentro de los hallazgos de la microscopia electrónica, cabe destacar la presencia de distintas células bacterianas las cuales pueden observarse en la Figura 16. En estas imágenes igualmente hay partículas virales señaladas con flechas naranjas las cuales miden 57 (Figura. 16A), 56.12 nm (Figura. 16B) y 56.2 nm (Figura. 16C).

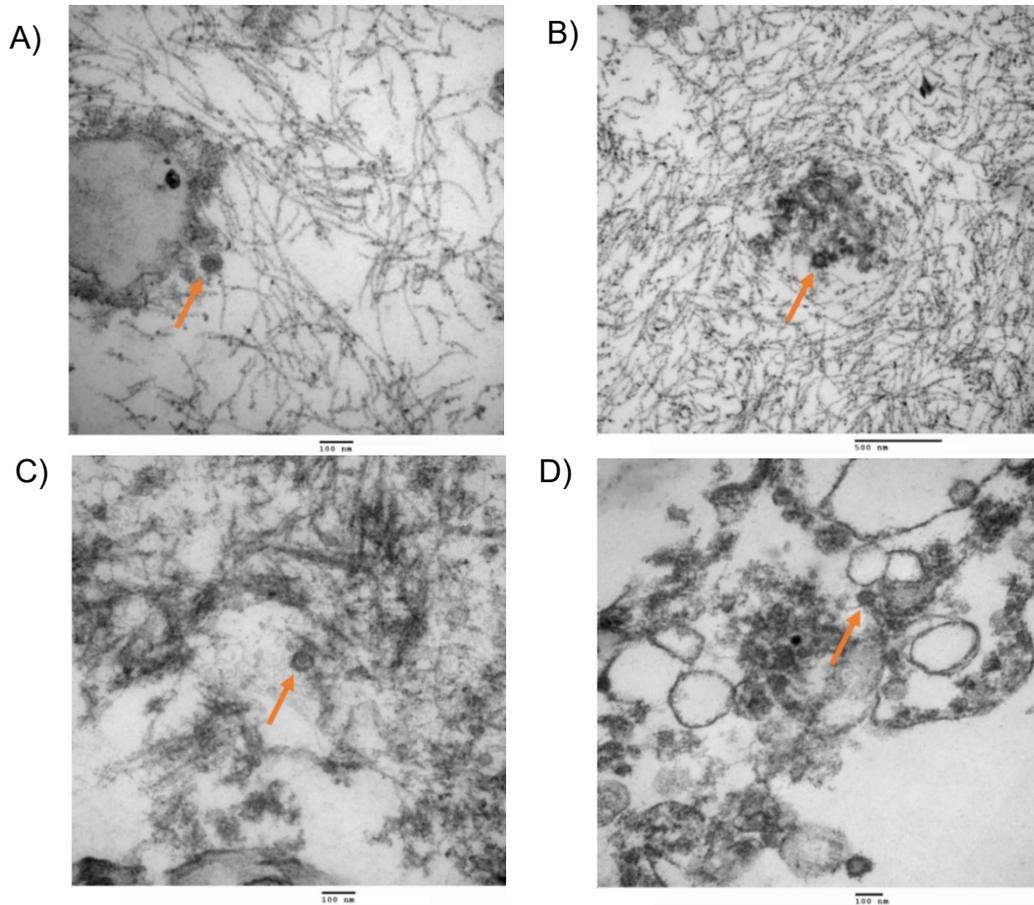


Figura 15. Determinación de presencia de VPH en MCV mediante Microscopía electrónica. Las figuras A y B corresponden a una paciente con VPH 16; y las figuras C y D a una paciente positiva para VPH 31. Las cápsidas virales se muestran con una flecha naranja. A (55.1 nm), B (57.6 nm), C (55 nm) y D (52.1 nm). La barra de escala corresponde a 100 nm en A, B y D y 500 nm en C.

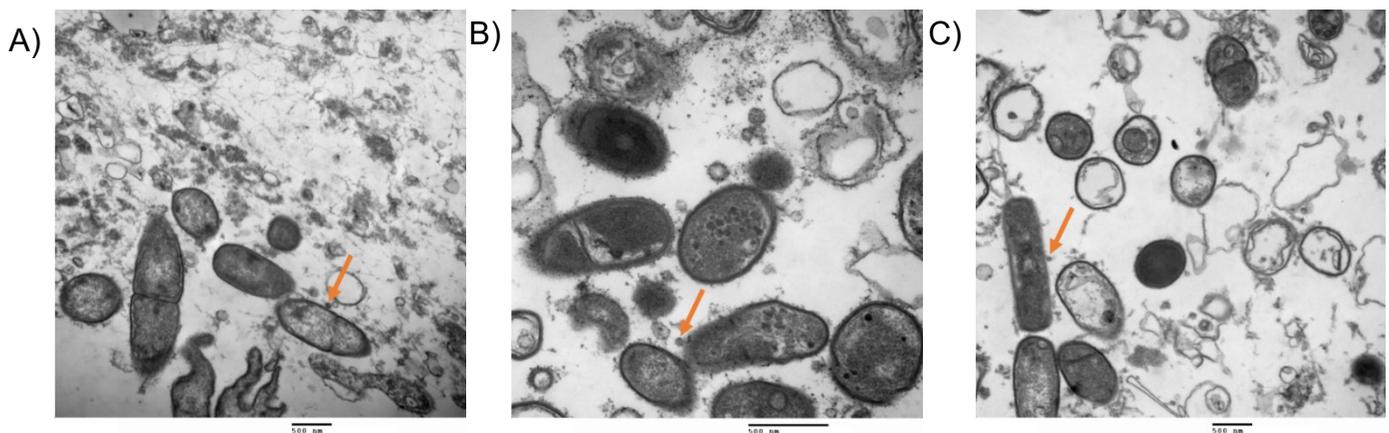


Figura 16. Microscopía electrónica de células bacterianas presentes en el moco cérvico-vaginal. Se observan las bacterias presentes en el moco cérvico-vaginal de pacientes con VPH 31 (A, B) y VPH 16 (C). Las partículas virales se muestran con flechas naranjas. La barra de escala corresponde a 500 nm.

7.3 Evaluación de la microbiota

Debido a la estrecha relación que ha sido descrita entre la microbiota y la infección por VPH, además de la amplia diversidad bacteriana encontrada al realizar la microscopía electrónica, se decidió evaluar la microbiota presente en el MCV.

Diversidad bacteriana

Para la secuenciación del gen 16S rRNA se decidió amplificar la región V4 debido a que esta brinda una mayor calidad en las secuencias, además de un mayor rendimiento (Van Der Pol, W. J. *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos con la secuenciación mostraron 203,982 secuencias en promedio por muestra. Además, se eliminaron quimeras y errores de secuenciación y se realizó una rarefacción a una profundidad de 65,000 secuencias por muestra para normalizar las comparaciones. Al utilizar la base de datos SILVA (SILVA_132) se obtuvo un total de 467 variantes de secuencia de amplicón (ASVs).

La diversidad alfa se refiere a la diversidad dentro de un ecosistema, la cual se expresa como el número de especies (riqueza) dentro del mismo. En este sentido, para estimar la diversidad bacteriana en cada muestra existen diferentes metodologías que se basan en la riqueza y/o en la proporción de cada una de esas especies en la muestra (abundancia) (Willis, A. D. 2019). Particularmente, en este trabajo se utilizó el número de ASVs observadas para medir la riqueza y el índice de diversidad de Shannon, el cual adicionalmente considera la abundancia dentro de cada muestra. Por otro lado, la diversidad beta clásicamente se define como la diferencia observada en la diversidad bacteriana entre dos ecosistemas (Wagner, B. D. *et al.*, 2018). Al igual que con la diversidad alfa, para evaluar la diversidad beta se utilizan distintas medidas que en este caso expresan la variabilidad entre diferentes individuos, por ejemplo, el índice de Bray-Curtis (Goodrich, J. K. *et al.*, 2014).

Como se ve reflejado en la figura 17A, existe una mayor riqueza y abundancia bacteriana en muestras VPH+ comparadas con las VPH-, en ambas medidas de diversidad alfa ($p=0.00037$, $p=0.00079$). Asimismo, la diversidad beta en las muestras se representa en la Figura 17B mediante un análisis de componentes

principales (PCoA) basado en el Índice de Bray-Curtis. Para determinar la contribución que tienen las características de la población (Tabla 3) sobre la composición de la microbiota vaginal, se realizó una prueba PERMANOVA. Con este análisis se observó que aproximadamente el 5.2% de la variación en la composición bacteriana ($p=0.003$) es explicado por la infección por VPH.

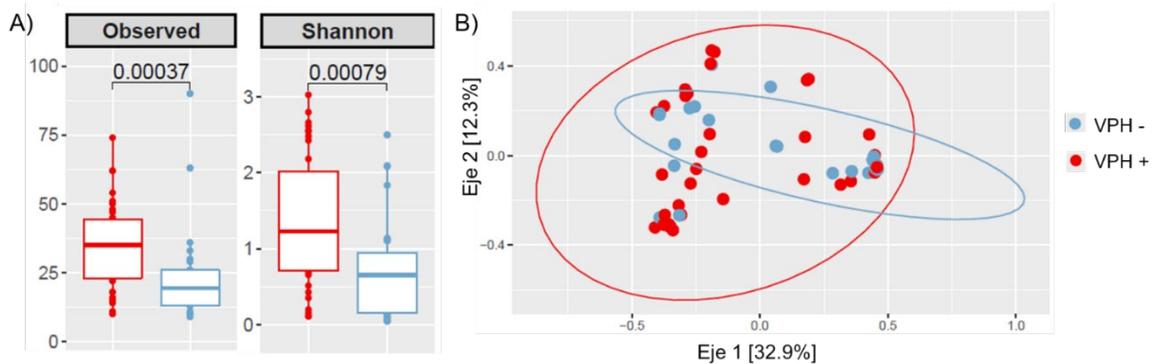


Figura 17. Diversidad bacteriana. A) Diversidad alfa en muestras VPH + y VPH - representada por el número de ASVs observados y el Índice de diversidad de Shannon. B) Diversidad beta en muestras VPH + y VPH - representada por PCoA basado en Índice de Bray-Curtis. Para el análisis se realizó una PERMANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Se analizaron 35 muestras VPH+ y 28 VPH-.

Por otro lado, para examinar la influencia de los tipos de VPH en la composición bacteriana se evaluó la diversidad alfa dividida por subtipo viral (Figura 18A). En esta figura se puede observar una mayor riqueza y abundancia bacteriana al comparar las muestras VPH 16 y VPH 31 con las VPH-. En la Figura 18B, se muestra el PCoA basado en el Índice de Bray-Curtis para representar la diversidad beta. Al realizar el análisis PERMANOVA, se demostró que aproximadamente el 19% de la variación ($p=0.049$) en la composición de la microbiota vaginal está dada por los subtipos de VPH.

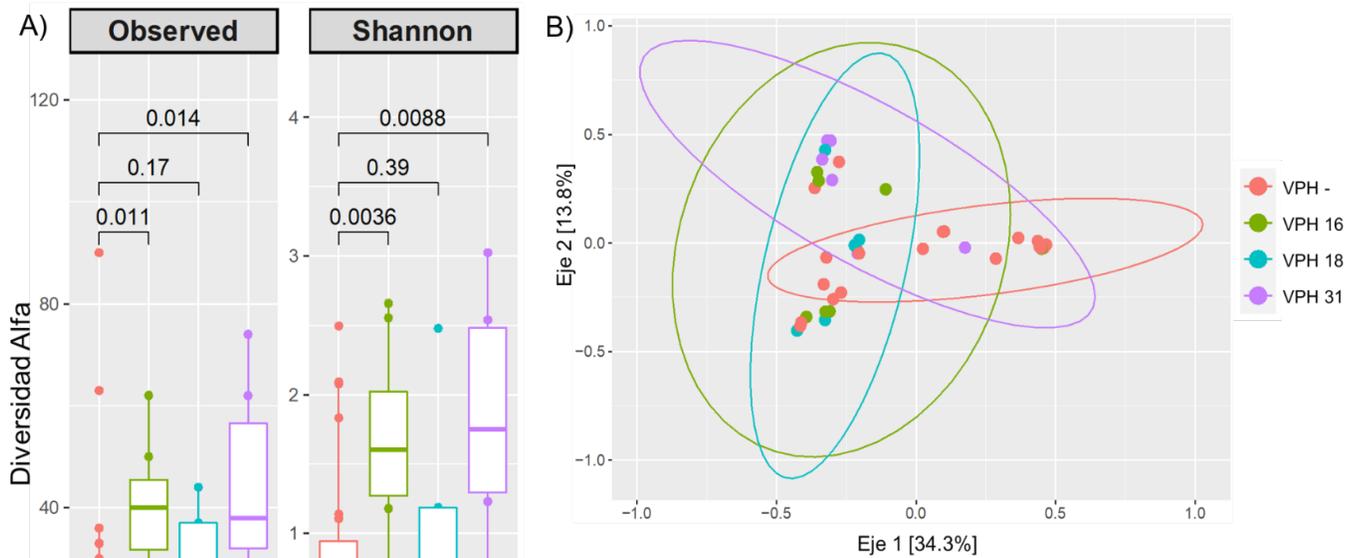


Figura 18. Diversidad bacteriana por tipo viral. A) Diversidad alfa en muestras VPH-, VPH 16, VPH 18 y VPH 31 representada por el número de ASVs observados y el Índice de diversidad de Shannon. B) Diversidad beta en muestras VPH-, VPH 16, VPH 18 y VPH 31 representada por PCoA basado en Índice de Bray-Curtis. Para el análisis se realizó una PERMANOVA. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$. Se analizaron 48 muestras: 8 VPH16, 5 VPH 18, 7 VPH 31 y 28 VPH-.

Perfil taxonómico

Con el objetivo de continuar con el análisis de los datos obtenidos en la secuenciación, se realizó la clasificación taxonómica. Con ella, se identificó a nivel filo una disminución en la abundancia de *Firmicutes* y un aumento en la abundancia de *Actinobacteria* y *Proteobacteria* en las muestras VPH+ comparado con las VPH- (Figura 19A). Esto también es consistente al separar las muestras por tipo viral (Figura 19B). En este sentido, el incremento de *Actinobacteria* se observa mayoritariamente en las muestras VPH 16 y VPH 18; mientras que se observa una gran abundancia de *Fusobacteria* en las muestras VPH 31. Adicionalmente, hay mayor proporción de *Proteobacteria* en las muestras VPH 16 y VPH 31. En el Anexo 2 se muestran los porcentajes de la abundancia relativa de los 5 *phyla* con mayor abundancia.

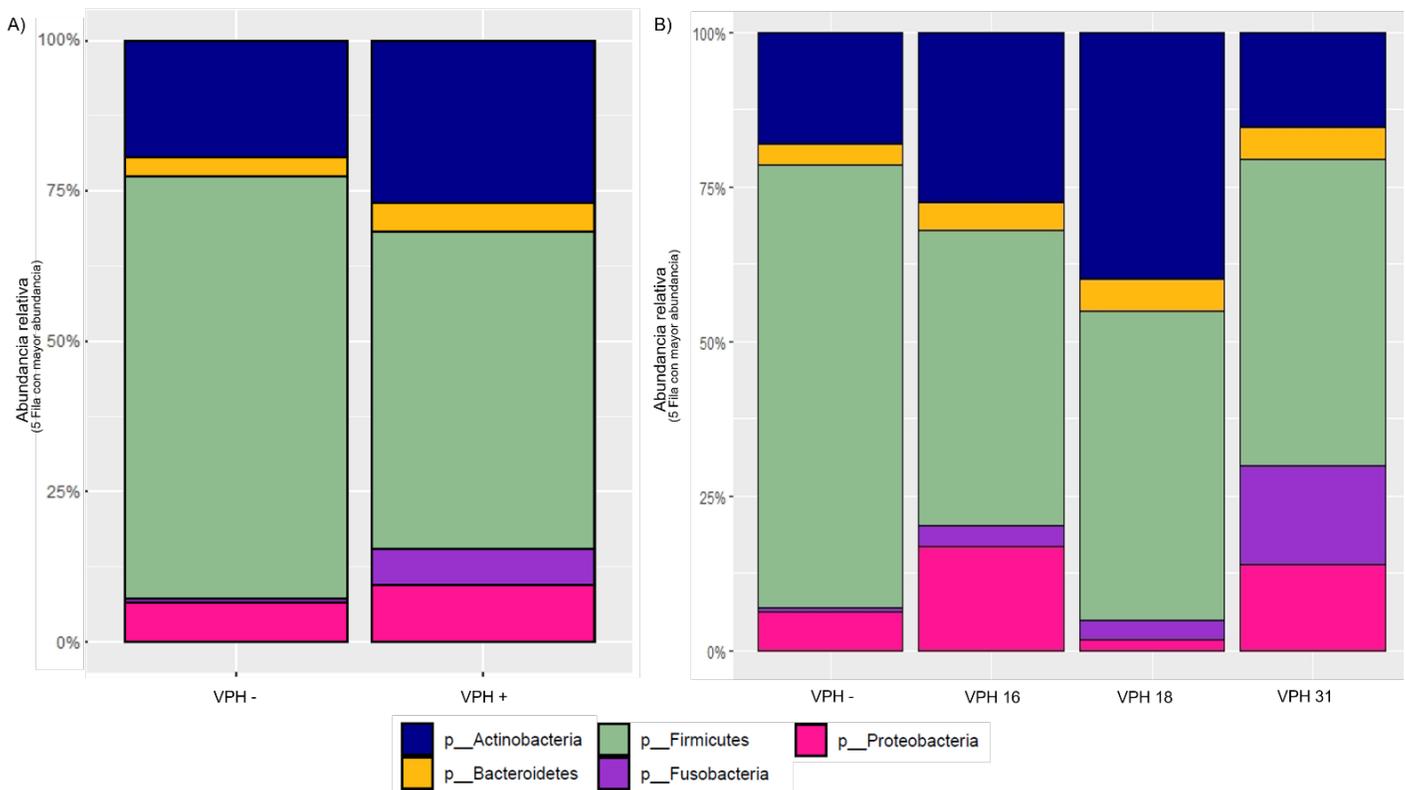
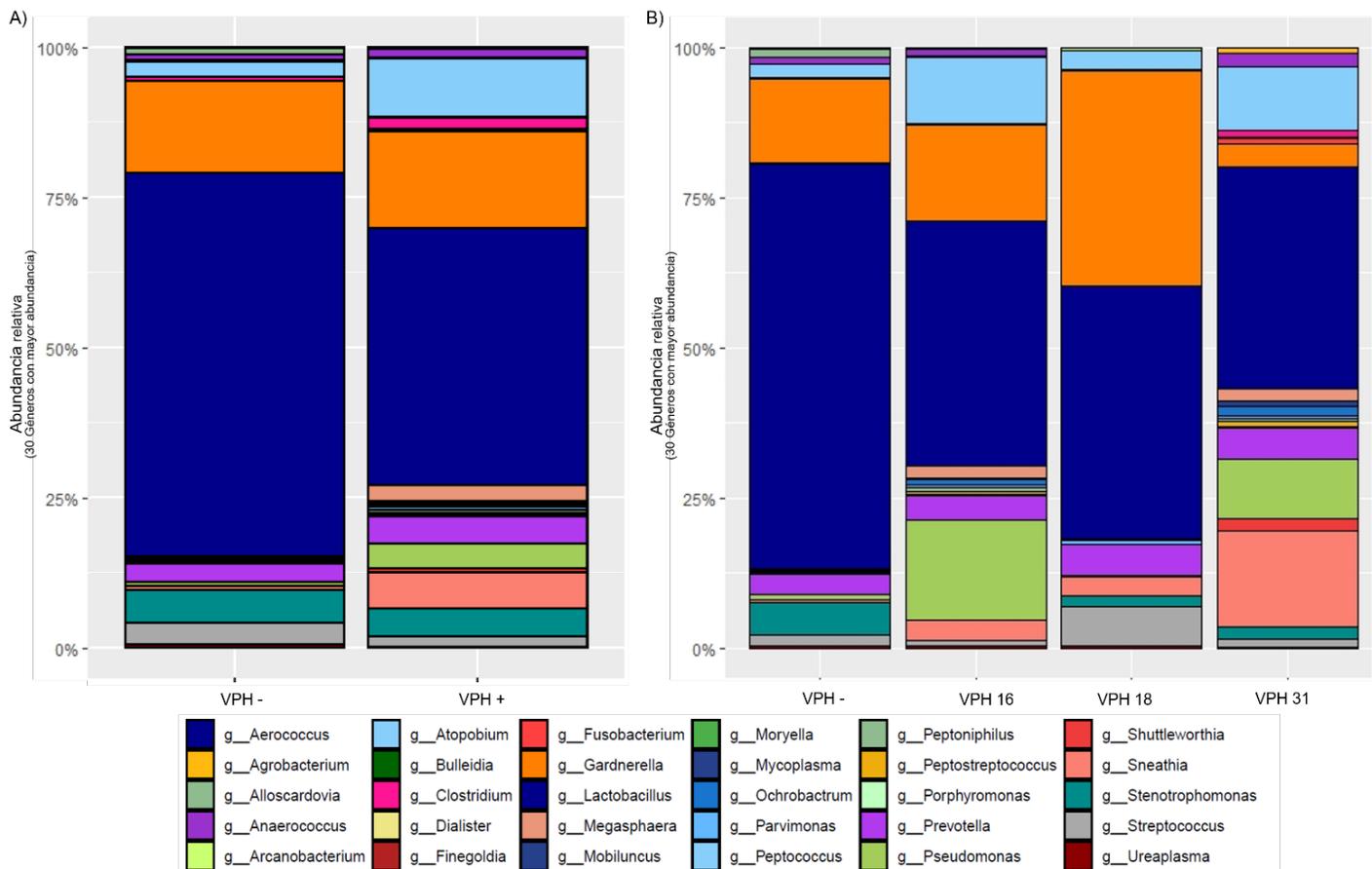


Figura 19. Composición de la microbiota a nivel *phylum*. Se muestra la abundancia relativa a nivel *phylum* en las muestras de MCV VPH- (n=28) y VPH+ (n=35) (A) y separado por subtipo viral: VPH 16 (n=8), VPH 18 (n=5), VPH 31 (n=7), VPH- (n=28) (B).

Por otra parte, a nivel género se encontraron más de 130 géneros representados en las muestras; siendo *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Atopobium* y *Sneathia* los más abundantes. Al evaluar la abundancia relativa de estos géneros en las muestras VPH+, se observa una menor cantidad de *Lactobacillus* al compararlo con las muestras VPH-. En contraste, se aprecia una mayor proporción de los géneros *Gardnerella*, *Atopobium* y *Sneathia* en el grupo VPH+ (Figura 20A). De la misma manera a lo observado a nivel *phylum*, el tipo viral influye en la variabilidad de la abundancia de los distintos géneros (Figura 20B). Dentro de los cambios más notorios se destacan el aumento en la proporción de *Gardnerella* en muestras positivas a VPH 18, *Pseudomonas* en pacientes infectadas con VPH 16 y VPH 31, *Atopobium* en muestras con presencia de VPH 16 y VPH 31 y *Sneathia*, *Shuttleworthia* y *Clostridium* en pacientes positivas a VPH 31. Por el contrario, en las muestras VPH 31 se observa una disminución en *Gardnerella*. En el Anexo 3 se

muestran los porcentajes de la abundancia relativa de los 30 géneros con mayor abundancia.



Finalmente, para identificar cuantitativamente las características responsables de la diferencia en la composición de la microbiota entre las muestras VPH+ y VPH-, se realizó el análisis de LEfSe. En la Figura 21 se muestran los taxones diferencialmente abundantes en las muestras VPH+ comparado con las muestras VPH-; entre las cuales se encuentran el orden *Clostridiales*; las familias *Coriobacteriaceae*, *Aerococcaceae*; y los géneros *Atopobium*, *Shuttleworthia*, *Parvimonas*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Mobiluncus*. Cabe destacar que no se identificaron taxones discriminantes para las muestras VPH-.

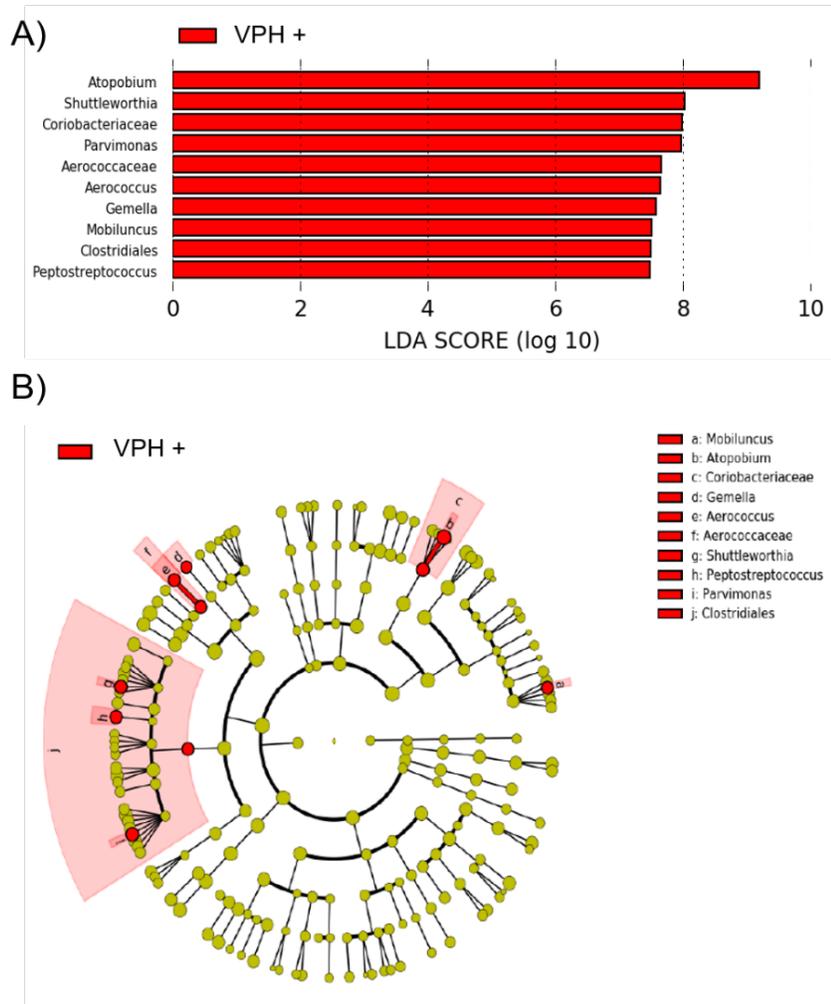


Figura 21. Análisis de LefSe. Análisis de LefSe comparando las variaciones bacterianas entre los grupos VPH + y VPH-. A) Histograma de los valores de LDA de las características diferencialmente expresadas en las muestras VPH+. B) Cladograma que representa las taxa diferencialmente abundantes en las muestras VPH+. Se analizaron 35 muestras VPH+ y 28 VPH-.

7.4 Cuantificación de citocinas y quimiocinas en moco cérvico-vaginal

La relación descrita previamente entre la infección por VPH y los cambios en el microbioma también ha sido asociada a una alteración del sistema inmune (Ilhan, Z. E. *et al.*, 2019); por esta razón se decidió evaluar la respuesta inflamatoria en el MCV.

Debido a que la formación de algunos complejos entre MEC y proteínas virales son capaces de desencadenar una respuesta inflamatoria mediada por la activación de TLRs (de Witte *et al.*, 2007; Nazli *et al.*, 2013), resulta importante el estudio de este

proceso. En relación con esto, en un trabajo previo en nuestro laboratorio (datos no publicados) se encontró que hay una mayor cantidad de pro-IL-18 en tejido proveniente de pacientes con eversión glandular e infección por VPH. Además, se apreció que en las muestras infectadas por VPH 31 había una mayor cantidad de esta citocina. Por lo tanto, se decidió evaluar la presencia de IL-18 en el MCV de mujeres con eversión glandular.

ELISA

Al evaluar la concentración de IL-18 mediante ELISA se observó una mayor cantidad de esta citocina en las muestras de mujeres con infección por VPH, en contraste con aquellas no infectadas, aunque esta diferencia no es significativa (Figura 22A). Al analizar los resultados mostrados por subtipo viral, se puede ver que hay una mayor producción de IL-18 en las pacientes con VPH 31 comparado contra VPH- ($p=0.048$); igualmente, se hace evidente una diferencia ($p=0.032$) entre las muestras VPH 31+ y las que tienen una coinfección con varios subtipos virales (Figura 22B).

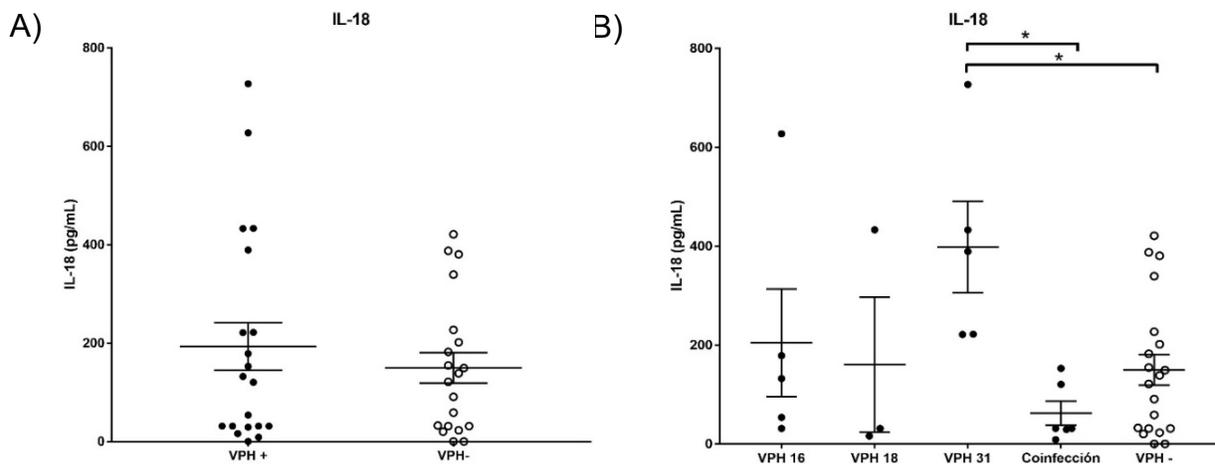


Figura 22. Concentración de IL-18 en moco cérvico-vaginal. Concentración de IL-18 en moco cérvico-vaginal de mujeres VPH+ (n=20) vs. VPH- (n=20) (A). Y en B se muestra desglosado por subtipo: VPH 16 (n=5), VPH 18 (n=3), VPH 31 (n=5), Coinfección (n=6) vs. VPH- (n=20). Para el análisis se realizó una prueba de U de Mann-Whitney (A) y una prueba de Kruskal-Wallis con prueba post hoc de Dunn (B). Las barras de error representan el SEM. Se tomó como significativo un valor de $p < 0.05$ (*).

Citometría de flujo

Con la intención de evaluar la posible respuesta inflamatoria desencadenada debido a la infección por VPH, se realizó, mediante citometría de flujo, la cuantificación de citocinas en MCV. En la Tabla 4 se muestra la concentración de las distintas citocinas evaluadas en pg/mg después de realizar el ajuste por proteína como fue descrito por Marks *et al.* en 2012. En esta tabla se destaca una mayor concentración de IL-21 en el grupo VPH+ comparado con el grupo VPH- ($p= 0.013$).

Citocina	No. de muestras dentro de rango de detección, <i>n</i> (%)		Concentración media (pg/mg)		
	VPH + n=38	VPH- n=30	VPH + n=38	VPH- n=30	valor de <i>p</i>
IL-1 β	38 (100)	30 (100)	1014	924.9	0.923
IL-2	10 (26)	10 (33)	6.54	3.58	0.056
IL-4	7 (18)	10 (33)	8.79	2.16	0.070
IL-6	23 (61)	19 (63)	64.48	155.1	0.980
IL-8	38 (100)	29 (100)	9,183.03	6,258.94	0.305
IL-9	10 (26)	12 (40)	5.86	9.29	0.123
IL-10	0 (0)	1 (3)	-	2.05	-
IL-12p	4 (10)	7 (23)	26.63	48.22	0.164
IL-13	5 (13)	3 (10)	12.77	9.75	>0.999
IL-17B	4 (11)	6 (20)	5.37	3.73	0.257
IL-21	20 (53)	19 (63)	27.81	6.91	0.013
IL-22	32 (84)	30 (100)	1594	1118	0.733
TNF- α	4 (11)	5 (17)	27.76	20.19	0.413
IFN- γ	14 (37)	18 (60)	26.87	15.18	0.398

Tabla 4. Citocinas presentes en el moco cérvico-vaginal de mujeres VPH+(n=38) y VPH- (n=30). Para el análisis se realizó una prueba de U de Mann-Whitney. Se tomó como significativo un valor de $p<0.05$.

En cuanto al resto de las citocinas presentes en el MCV existe una mayor cantidad de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-13, IL-17B, IL-22, TNF- α e IFN- γ en el grupo VPH+, aunque no haya una diferencia significativa. Mientras que hay una mayor cantidad de IL-6, IL-9 e IL-12p en el grupo VPH-, aunque esta diferencia no es significativa (Tabla 4).

Otros factores importantes en el proceso inflamatorio son las quimiocinas, ya que tienen un papel en el reclutamiento de células del sistema inmune en respuesta a

daño y patógenos; por esta razón se decidió evaluar la presencia de quimiocinas en el MCV. En la tabla 5 se puede ver que hay una mayor concentración de MIG y CXCL5 en el grupo VPH+ comparado con el grupo VPH- ($p= 0.005$, $p=0.035$, respectivamente). Adicionalmente, al analizar el resto de las quimiocinas presentes en el MCV, se distingue una tendencia al aumento de 1P-10, MCP-1 y CXCL1 en el grupo VPH+. En el caso de Eotaxin, CCL17, RANTES, MIP-1 α , MIP-3 α y MIP-1 β hay una mayor concentración de estas quimiocinas en el grupo VPH-, aunque esta diferencia no es significativa.

Quimiocina	No. de muestras dentro de rango de detección <i>n</i> (%)		Concentración media (pg/mg)		
	VPH + n=38	VPH- n=29	VPH + n=38	VPH- n=29	valor de <i>p</i>
1P-10	26 (68)	14 (48)	70.26	25.71	0.548
Eotaxin	32 (84)	23 (79)	9.81	19.62	0.468
CCL17	38 (100)	29 (100)	11.5	15.51	0.681
MCP-1	29 (76)	25 (86)	240.8	113	0.806
RANTES	31 (82)	23 (79)	32.32	38.7	0.752
MIP-1α	35 (92)	26 (90)	28.21	41.38	0.635
MIG	24 (63)	19 (66)	66.53	15.34	0.005
CXCL5	33 (87)	26 (90)	174.4	100.5	0.035
MIP-3α	24 (63)	20 (69)	29.01	48.41	0.985
CXCL1	35 (92)	25 (86)	532	307.9	0.752
I-TAC	16 (42)	14 (48)	11	10.9	0.574
MIP-1β	22 (58)	21 (72)	27.26	50.75	0.871

Tabla 5. Quimiocinas presentes en el moco cérvico-vaginal de mujeres VPH+(n=38) y VPH- (n=29) (Mismas muestras utilizadas para evaluar las citocinas). Para el análisis se realizó una prueba de U de Mann-Whitney. Se tomó como significativo un valor de $p<0.05$.

7.5 Asociaciones entre VPH, microbiota vaginal e inflamación

A continuación, para determinar la asociación entre los marcadores de inflamación y la composición de la microbiota sin estratificar las muestras por infección viral, se realizó una correlación de Spearman entre los 10 marcadores de inflamación que tuvieron menos de 25% de determinaciones por debajo del límite de detección (IL-1 β , IL-8, IL-22, Eotaxin, CCL17, MCP-1, RANTES, MIP-1 α , CXCL1 y CXCL5) y los 27 géneros bacterianos con mayor abundancia (Figura 23).

En cuanto a los marcadores de inflamación, se observa una fuerte correlación positiva entre IL-1 β e IL-22 ($r = 0.904$). De igual forma, se aprecian correlaciones positivas entre las quimiocinas. Por el contrario, se muestra una correlación negativa entre MCP-1 con IL-1 β e IL-22, así como entre CXCL1 e IL-1 β .

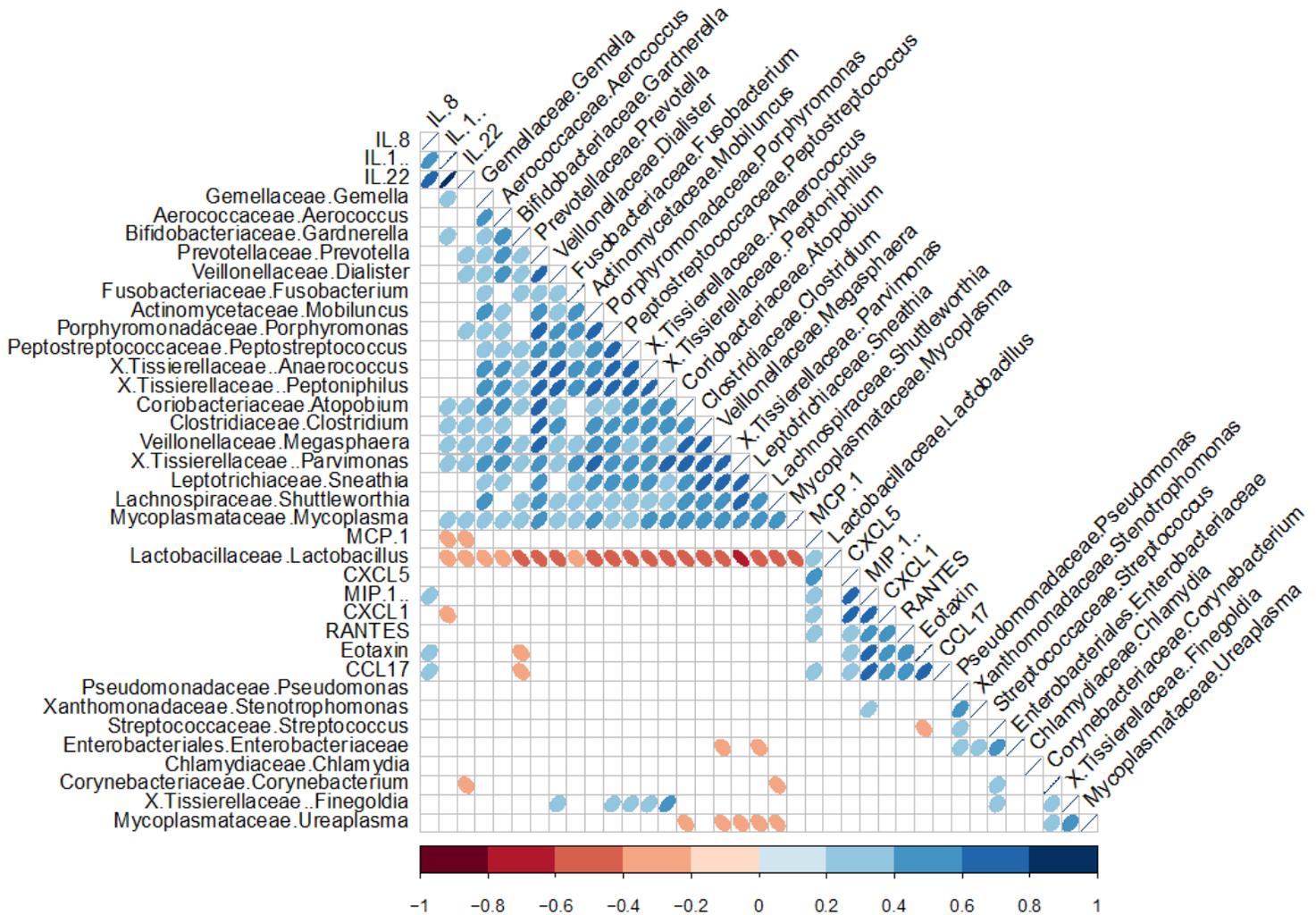


Figura 23. Correlación entre marcadores de inflamación y géneros bacterianos. Correlación de Spearman entre 3 citocinas, 7 quimiocinas y 27 géneros bacterianos. Solamente se muestran los resultados con un valor de $p < 0.05$. En tonos de azul se muestran las correlaciones positivas ($0 < r < 1$) y en tonos de rojo las correlaciones negativas ($-1 < r < 0$). Se analizaron 35 muestras VPH+ y 28 VPH-.

Adicionalmente, se aprecia que la mayoría de los géneros bacterianos correlacionan positivamente entre sí; por el contrario, el género *Lactobacillus* tiene una correlación negativa con la mayoría de ellos. Asimismo, se observa una correlación negativa

entre el género *Lactobacillus* y las citocinas IL-1 β e IL-22, mientras que MCP-1 tiene una correlación positiva con este género. De manera interesante, el género *Gardnerella* correlaciona negativamente con Eotaxin y CCL17.

Finalmente, con el propósito de integrar los resultados obtenidos se realizó un mapa de calor el cual incluye los 15 géneros bacterianos más abundantes y los 7 marcadores de inflamación en las poblaciones VPH+ y VPH- (Figura 24).

En esta figura se distingue una mayor abundancia de *Lactobacillus* en el grupo VPH- comparado con los grupos positivos para cualquier tipo de VPH. En concreto, el 57% de las muestras VPH- son *Lactobacillus*-dominante, mientras que solamente el 25% de las muestras VPH+ tienen dominancia por este género, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.037$). Por otro lado, en las muestras dentro del grupo VPH- que no tuvieron dominancia por *Lactobacillus* se puede observar el incremento en la presencia de otros géneros bacterianos. En cambio, en las muestras VPH+ sin importar el tipo viral, hay una mayor abundancia de otros géneros diferentes a *Lactobacillus*.

En cuanto a los marcadores de inflamación, no se aprecia claramente alguna característica que discrimine entre las VPH+ y VPH-. El grupo VPH- muestra una heterogeneidad en cuanto a los marcadores inflamatorios, mientras que en las muestras VPH+ independientemente del tipo viral existe una mayor expresión de citocinas proinflamatorias aunque no es significativo. Finalmente, la presencia de *Lactobacillus* en todos los grupos está acompañada de cierta expresión de MCP-1.

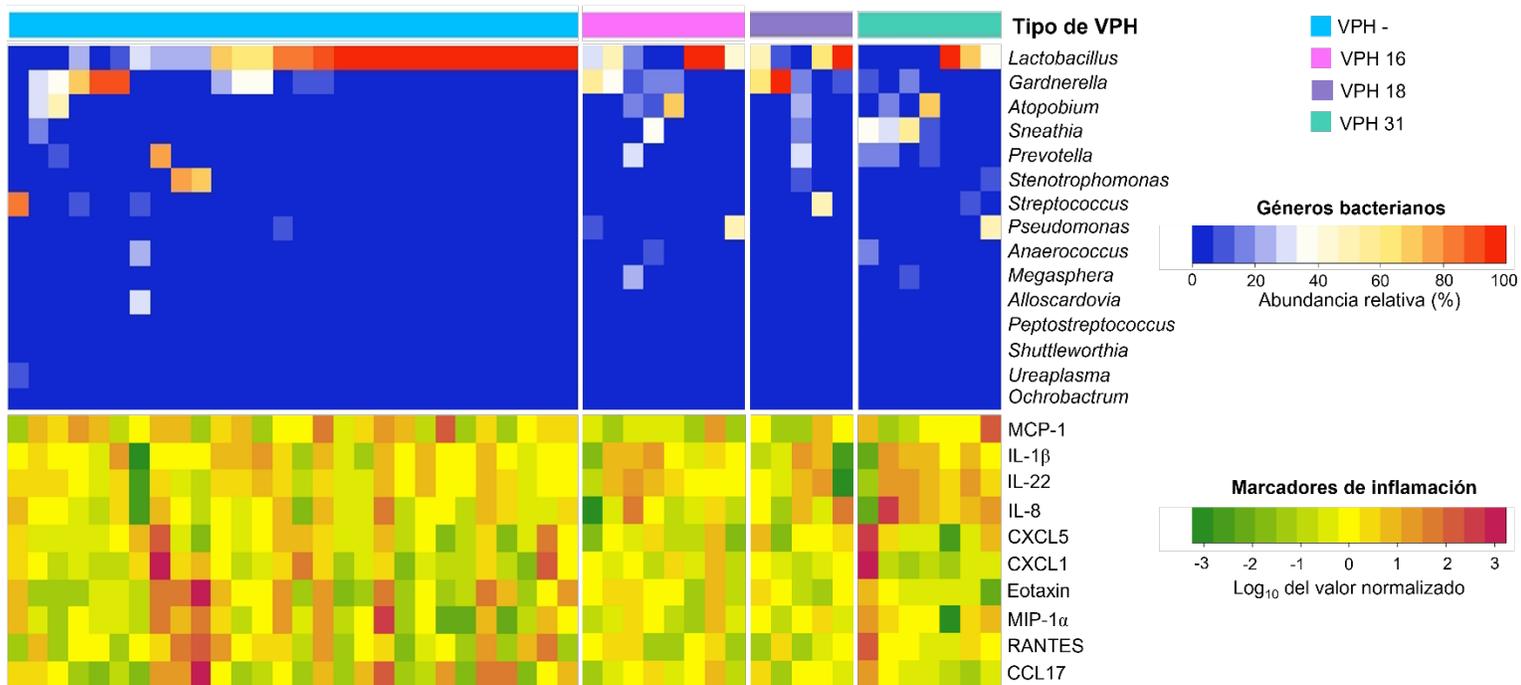


Figura 24. Mapa de interacción VPH-microbiota-inflamación. En la parte superior se muestra el porcentaje de abundancia relativa de los 15 géneros más representativos separados por la presencia o no de los subtipos de VPH. En la parte inferior, se observan los marcadores inflamatorios presentes en el MCV normalizado como se describe en la metodología. Cada columna representa a una paciente: VPH- (n=28), VPH 16 (n=8), VPH 18 (n=5), VPH 31 (n=7).

8. Discusión

8.1 Población de estudio

La eversión glandular o ectopia cervical a pesar de ser considerada una condición benigna en el cérvix, ha sido asociada a la infección por *Chlamydia trachomatis* (Lee, V. *et al.*, 2006), VIH (Venkatesh, K. K. & Cu-Uvin, S. 2013) y VPH (Toon, P. G. *et al.*, 1986; Veress, G. *et al.*, 1986). Algunos reportes mencionan que hay una mayor susceptibilidad para adquirir VPH en pacientes con eversión glandular al compararse con aquellas que no la presentan (Rocha-Zavaleta, L. *et al.*, 2004). Lo cual concuerda con los resultados que se obtuvieron en el presente estudio.

Adicionalmente, la prevalencia de la infección por VPH está asociada a distintos factores de riesgo como la edad (Burk, R. D *et al.*, 1996; Bruni, L. *et al.*, 2019), el número de parejas sexuales, el inicio de la vida sexual activa (Burk, R. D. *et al.*, 1996) y el uso de anticonceptivos hormonales (Smith, J. S. *et al.*, 2003). En este trabajo solamente se encontró una asociación entre el número de parejas sexuales y la presencia de VPH. En este sentido, se ha propuesto que tener un mayor número de parejas sexuales incrementa la exposición al virus, y por lo tanto, el riesgo de adquirir una infección por éste aumenta (Ley, C. *et al.*, 1991; Vaccarella, S. *et al.*, 2006).

En nuestro estudio no se encontró una diferencia significativa en cuanto al resto de los factores de riesgo para la infección por VPH, como lo reportado en la literatura; esto puede deberse al número de pacientes que se tienen en esta muestra (n=162) comparado con otros estudios que cuentan con más de 5000 registros (Roset Bahmanyar, E. *et al.*, 2012; Torres-Poveda, K. *et al.*, 2019).

8.2 Detección del VPH en moco cérvico-vaginal

La detección del VPH es crucial para la prevención y el diagnóstico temprano de CaCU. Por lo tanto, se han desarrollado varios métodos con este fin. En una serie de trabajos se ha demostrado que el DNA de VPH se puede detectar en diversos fluidos humanos como, por ejemplo, plasma y saliva de pacientes con carcinoma de cabeza y cuello (Wang, Y. *et al.*, 2015), o en sangre menstrual y moco cérvico-vaginal de aquellas con LSIL, HSIL y CaCU (Jentschke, M. *et al.*, 2013). Por otro

lado, Deleré *et al.* (2011) reportaron mediante un ensayo de multiplex que los tipos de VPH presentes en el MCV corresponden a los que se encuentran infectando el tejido cervical. A pesar de que las técnicas de detección en fluidos no son invasivas, su uso en la clínica aun es debatido.

Uno de los métodos comúnmente utilizados para la detección del VPH en tejidos es la PCR y para esto se emplean tres juegos de oligonucleótidos universales: MY09/11, L1C1/L1C2 y p11/p12 (Husnjak, K. *et al.*, 2000). En varios estudios se ha propuesto el uso de más de un juego de oligos para su identificación, ya que utilizar solamente uno puede subestimar la presencia del VPH en las muestras, generando falsos negativos (Karlsen, F. *et al.*, 1996). Por esta razón, se decidió evaluar si era posible hallar el virus en el MCV de las pacientes que ya contaban con el diagnóstico de VPH+ en tejido. En nuestro estudio, al usar los oligos MY09/11, se encontró el DNA viral en una menor proporción de muestras que con los iniciadores L1C1/L1C2. La diferencia tan amplia en la detección con cada juego de oligos concuerda con reportes donde se menciona que MY09/11 no es tan específico para identificar algunos de los tipos de VPH (Remmerbach, T. W. *et al.*, 2004; Depuydt, C. E. *et al.*, 2007), mientras que L1C1/L1C2 es más eficaz (Mori, S. *et al.*, 2011). Una alternativa para mejorar la eficiencia de esta técnica es agregar el juego GP5+/6+, o también realizar un ensayo de oligos-múltiples como PGMY09/11 y SPF-PCR (International Agency for Research on Cancer, 2007).

Gracias a que se tenía conocimiento previo del tipo viral presente en el tejido, se evaluó si era posible detectar al mismo subtipo viral en el MCV. De esta manera, la eficiencia para la identificación de VPH 16, 18 y 31 fue de 85%, 100% y 43% respectivamente. El hecho de que no se pudiera detectar al virus en el 100% de las muestras podría deberse a que el virus no estaba presente en suficiente cantidad en esa fracción de moco analizado o a que la técnica no es tan sensible para realizar la genotipificación. Por esta razón, para futuros trabajos se podrían evaluar los tipos virales presentes en el MCV mediante TS-MPG (Clifford *et al.*, 2016). Se ha reportado que esta metodología tiene una sensibilidad alta debido a que utiliza iniciadores específicos para cada tipo de VPH, además de amplificar una región

más pequeña del DNA viral (Schmitt, M. *et al.*, 2010). Esta metodología es capaz de detectar infecciones con un bajo número de copias de DNA al igual que la presencia de coinfecciones por distintos subtipos virales (Comar, M. *et al.*, 2012).

De igual forma se ha planteado el uso de ELISA para la identificación del VPH; donde se utilizan partículas de tipo virus (VLPs) para la captura de anticuerpos contra VPH (International Agency for Research on Cancer, 2007). Adicionalmente, el grupo de Martin Sapp (véase Rommel, O. *et al.*, 2005) ha propuesto el uso de HSPGs para la unión y detección del VPH. En nuestro trabajo, al utilizar esta metodología, se observó que es posible encontrar al VPH en MCV, aunque solamente en una baja proporción de las muestras. Esto puede deberse a varios factores: la cantidad de partículas virales libres en el moco cervicovaginal, a la especificidad del anticuerpo utilizado (Crowther, J. R., 2010) o a un cambio conformacional en la proteína L1 tras su unión a los HSPGs (Buck, C. *et al.*, 2013). También es importante considerar que aun continúa en investigación el ciclo de vida del VPH en el epitelio glandular. Debido a que existe no evidencia de que se esté llevando a cabo la replicación viral en este tejido, se podría suponer que no hay producción y liberación de viriones al moco (Cortez Hernandez, F. J. 2020). Esto podría explicar por qué no se encontraron partículas virales libres en todas las pacientes.

Por otro lado, la detección del VPH se ha realizado previamente mediante microscopía electrónica de transmisión en el epitelio oral (Blioumi, E. *et al.*, 2014) y cervical (Ferenczy, A. *et al.*, 1981; Toki, T. *et al.*, 1986); pero esto no se había hecho en moco cérvico vaginal. En las cuatro muestras evaluadas en este trabajo, se encontraron partículas virales libres con tamaños similares a los descritos para VPH (Howley, P. M. & Lowy, D. R., 2004); además de una gran diversidad de bacterias. Como se ha reportado, las partículas virales pueden difundir libremente en el MCV (Olmsted, S. S. *et al.*, 2001) y por lo tanto, éste podría servir como un reservorio del VPH.

8.3 Asociaciones entre VPH, microbiota vaginal e inflamación

Estudiar la interacción entre el VPH, la microbiota y los cambios inflamatorios en el MCV nos puede ayudar a comprender más sobre la patogénesis del VPH en el epitelio glandular cervical.

La mayoría de los estudios que se han realizado para evaluar la relación entre el VPH y la microbiota, han reportado una mayor diversidad bacteriana en las muestras provenientes de mujeres infectadas con este virus (Mitra, A. *et al.*, 2015; Di Paola, M. *et al.*, 2017). En concordancia con esos trabajos, en nuestras muestras se encontró una mayor diversidad bacteriana en aquellas VPH+ comparado con las VPH-; además de un aumento significativo de la diversidad en las VPH 16 y VPH 31. Esto podría indicar que el subtipo de VPH también es un factor que modifica la composición de la microbiota.

El aumento en la diversidad bacteriana en las muestras VPH+, que se observa en la figura 17, probablemente está dado por la disminución de *Lactobacillus* y el incremento de algunas bacterias anaerobias, como ha sido reportado anteriormente (Di Paola, M. *et al.*, 2017). En conjunto, los resultados que se presentan en las figuras 20 y 21 muestran un aumento en algunos de los géneros bacterianos que han sido asociados con la persistencia de la infección por VPH y el desarrollo de LSIL: *Anaerococcus* (Chen, Y. *et al.*, 2020), *Atopobium* (Huang, X. *et al.*, 2018; Romero-Morelos, P. *et al.*, 2019), *Mobiluncus* (Calore, E. *et al.*, 1995), *Gardnerella* y *Sneathia* (Audirac-Chalifour, A. *et al.*, 2016). Asimismo, el incremento de *Shuttelworthia* ha sido relacionado con HSIL (Chen, Y. *et al.*, 2020). Estos resultados sugieren que las infecciones tempranas por VPH tienen un papel relevante en la disbiosis vaginal, y que la presencia de algunas bacterias podría contribuir a la generación de lesiones cervicales y CaCU.

Es importante destacar que la distribución de los géneros bacterianos se ve diferencialmente expresada dependiendo del tipo viral presente en el MCV. En concreto, la presencia de *Atopobium* ha sido identificado como un factor ligado a la infección por VPH 16 en mujeres con LSIL (Huang, X. *et al.*, 2018), y a infecciones virales persistentes (Di Paola, M. *et al.*, 2017). De manera relevante, nuestros

resultados también muestran una relación entre la presencia de *Pseudomonas* y VPH16.

Adicionalmente, en la literatura existen muy pocos estudios donde se relacione la presencia de VPH 18 o VPH 31 (Rodríguez-Cerdeira, C. *et al.*, 2012) con modificaciones particulares de la microbiota; en relación con esto, en nuestro trabajo encontramos un aumento de *Gardnerella* en muestras infectadas por VPH 18 y *Sneathia*, *Shuttleworthia* y *Clostridium* en pacientes positivas a VPH 31.

Por otra parte, la clasificación taxonómica de las bacterias a nivel especie es compleja, debido a que la región V4 del gen 16S no permite discriminar entre ellas por a la similitud de las secuencias (Johnson, J. S. *et al.*, 2019). A pesar de eso, en este trabajo se identificó a *L. iners* como la especie de *Lactobacillus* dominante en este cohorte; en concordancia con lo referido en la literatura, donde esta especie es la más abundante en mujeres mexicanas (Hernández-Rodríguez, C. *et al.*, 2011) y latinas (Ravel, J. *et al.*, 2011). De manera adicional, también se identificaron en menor proporción *L. jensenii*, *L. reuteri* y *L. vaginalis*.

En este sentido, el género *Lactobacillus* fue dominante en más de la mitad de las muestras VPH- y solamente en una cuarta parte de las VPH+. Esta dominancia por *Lactobacillus* correlacionó negativamente con la alta expresión de algunas citocinas. Una de éstas fue IL-1 β , la cual ha sido asociada a vaginosis bacteriana (Mitchell, C., & Marrazzo, J., 2014), displasia cervical (Behbakht, K. *et al.*, 2002) y HSIL (Iwata, T. *et al.*, 2015). Por otro lado, en ensayos de cultivo celular se ha observado que la presencia de *Atopobium* induce una gran liberación de esta interleucina (Doerflinger, S. Y. *et al.*, 2014). Cabe destacar que la liberación de esta citocina en su forma activa puede deberse a la activación del inflammasoma NLRP3 o NLRC4 los cuales son activados tras el reconocimiento de bacterias por distintos PRRs (Netea, M. *et al.*, 2010). Aunque también se sabe que su liberación puede ser inducida por DAMPs (damage-associated molecular patterns) como HMGB1 y S100A8/A9. Estos han sido asociado a las neoplasias causadas por la infección por VPH de alto riesgo (Escamilla-Tilch, M. *et al.*, 2013; Pang, X. *et al.*, 2014).

Otra de estas citocinas fue IL-22. En algunos reportes, se ha descrito que existe un aumento de esta interleucina cuando hay una colonización por bacterias como *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *N. gonorrhoea* y *E. coli* (Sabihi, M. *et al.*, 2020). Además, esta citocina se ha visto aumentada en el suero de pacientes con LSIL (Souza, J. M. *et al.*, 2013) y CaCU (Zhang, W. *et al.*, 2015). Asimismo, dentro de los pocos trabajos donde se relaciona a IL-22 con cáncer se propone que esta molécula, mediante la activación de STAT3, promueve la proliferación, la metástasis y disminuye la apoptosis (Eyerich, K. *et al.*, 2017). Con los resultados mostrados se podría especular que estas citocinas están asociadas a una microbiota diversa y al desarrollo de lesiones por VPH.

En contraste, el aumento de MCP-1 correlaciona positivamente con la dominancia por *Lactobacillus*. Clásicamente, MCP-1 es una de las principales moléculas quimioatrayentes de monocitos y células dendríticas; cuya existencia es considerada normal en el MCV. Se ha observado que su disminución aumenta la susceptibilidad a infecciones urinarias (Kirjavainen, P. V. *et al.*, 2009). Aunque también esta quimiocina ha sido asociada al uso de anticonceptivos hormonales en mujeres con una microbiota no *Lactobacillus*-dominante (Molatlhegi, R. P. *et al.*, 2020). Con esto se podría concluir que los niveles de expresión de estas citocinas están ligados a la composición de la microbiota, más que a la presencia del VPH en el MCV.

Por otro lado, independientemente a la composición microbiana se observó un incremento en la expresión de IL-21, MIG y CXCL5 en las muestras VPH+. La IL-21 es una citocina principalmente producida por células NK, T_{FH} y T_H17. Esta citocina regula tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa; además de tener un papel importante en la respuesta antiviral (Spolski, R. *et al.*, 2014). Esto concuerda con los resultados obtenidos ya que hubo un aumento de esta citocina en las mujeres con infección por VPH. Aunque se ha propuesto un papel antitumoral relacionado a la presencia de IL-21, específicamente en el CaCU el aumento de esta interleucina se ha asociado a la progresión de lesiones cervicales

precancerosas no reversibles, ya que su concentración es mayor en HSIL que en LSIL (Long, D. L. *et al.*, 2021).

En cuanto a las quimiocinas, MIG induce la migración de macrófagos, linfocitos citotóxicos y células NK en respuesta a IFN- γ el cual es un mediador de la respuesta antiviral (Ding, Q. *et al.*, 2016). Esta quimiocina se ha visto aumentada en el MCV de pacientes con infección por VPH (Shannon, B. *et al.*, 2017) lo que concuerda con nuestros hallazgos. Además, se ha observado un aumento de esta quimiocina en el suero de pacientes con CaCU y se ha propuesto su uso como marcador predictivo del pronóstico de la enfermedad (Zhi, W. *et al.*, 2014). Con respecto a CXCL5, es producida principalmente por células endoteliales y monocitos; y su liberación está asociada a la expresión de genes inflamatorios mediada por la activación de NF- κ B durante fases agudas de inflamación (Chandrasekar, B. *et al.*, 2003). Su papel biológico radica en la atracción y activación de neutrófilos; aunque también ha sido implicado en una serie de enfermedades inflamatorias y en cáncer (Walz, A. *et al.*, 1997; Hu, B. *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha observado la sobreexpresión de CXCL5 en biopsias y en líneas celulares de CaCU. De la misma forma, su administración exógena *in vitro* promueve la proliferación y migración de células HeLa (Feng, X. *et al.*, 2018); en tanto que su inhibición induce apoptosis en células HeLa y SiHa (Bai, L. *et al.*, 2020).

En la figura 25, donde se integran todos los resultados, se muestra la interacción entre el VPH y la microbiota vaginal en condiciones de eversión glandular. De manera global, en ausencia del VPH predomina una microbiota *Lactobacillus*-dominante, la cual a su vez correlaciona positivamente con la presencia de MCP-1. En contraste, cuando el VPH está presente, se observa una menor proporción de muestras con microbiota *Lactobacillus*-dominante y un incremento de bacterias patógenas lo cual se acompaña de una mayor expresión de citocinas inflamatorias.

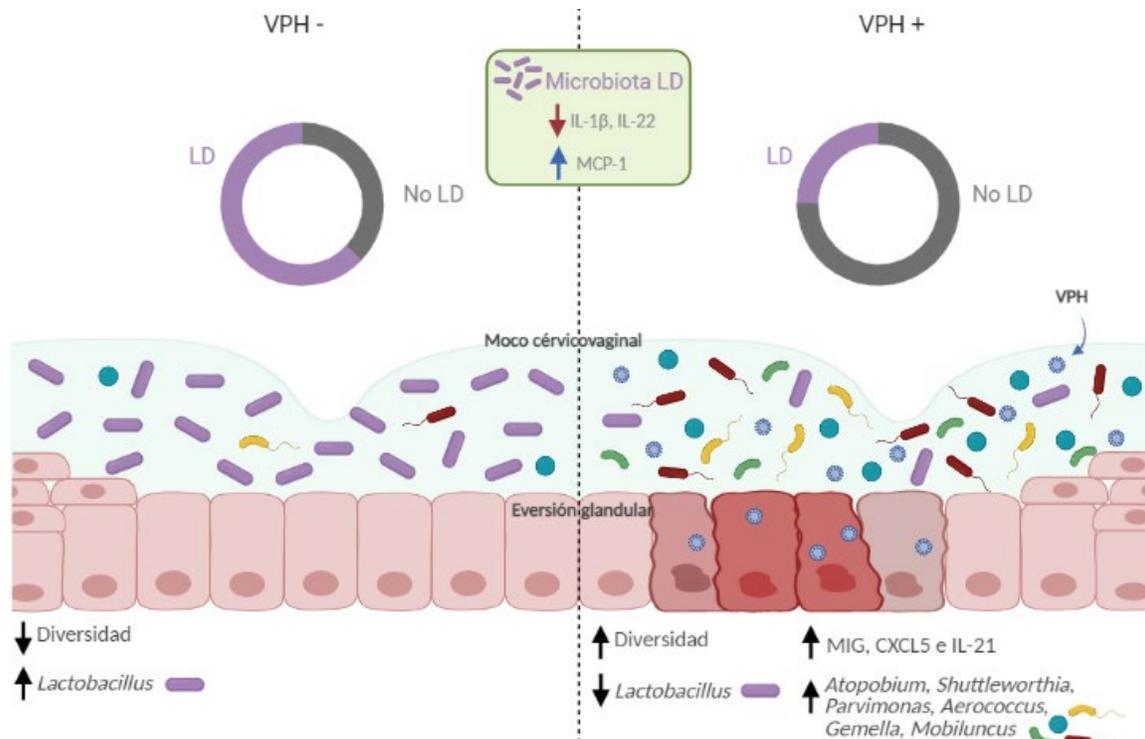


Figura 25. Interacción entre VPH y microbiota vaginal. Del lado izquierdo se representa la composición del microambiente del endocérnix en ausencia de VPH, en el cual predomina el género *Lactobacillus*. Del lado derecho, se observa el incremento de la diversidad bacteriana dado por bacterias patógenas en presencia de VPH; además del aumento en la expresión de moléculas inflamatorias. Finalmente, en el cuadro central se muestran las moléculas inflamatorias que correlacionan positiva o negativamente con la microbiota *Lactobacillus*-dominante independientemente de la presencia o ausencia del VPH. **LD:** *Lactobacillus*-dominante; **No LD:** No *Lactobacillus*-dominante. Figura realizada en Biorender.

De manera adicional, en un trabajo previo en nuestro laboratorio se evaluó la pro-IL-18 en tejido glandular evertido (datos no publicados). En ese primer acercamiento, se observó una mayor cantidad en las muestras VPH+, especialmente en las VPH 31. En concordancia con ese hallazgo, en el MCV se encontró una diferencia en la concentración de IL-18 significativamente mayor en las VPH 31 comparado contra VPH-. En este sentido, la liberación de la IL-18 madura se puede dar por la activación de algunos PRRs como los NLRs y los AIM2-like receptor tras el reconocimiento de bacterias o virus. Su liberación al medio tiene un papel importante en la defensa contra infecciones ya que acentúa la producción de IFN- γ , óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno por parte de los fagocitos; además de activar a los linfocitos CD8 los cuales participan en la eliminación de la infección viral (Yasuda, K. *et al.*, 2019).

Es conveniente destacar que el VPH 31 fue el segundo tipo viral con mayor incidencia en la cohorte evaluada, a pesar de que la estadística nacional lo coloca en el cuarto lugar (Ochoa Carrillo, F. J. *et al.*, 2015). Además, estas muestras tuvieron una gran diversidad bacteriana dada por el aumento de *Sneathia*, *Shuttleworthia*, *Pseudomonas*, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Clostridium* y *Atopobium*. Estos datos en conjunto sugieren que este subtipo viral está fuertemente relacionado con modificaciones al microambiente vaginal, por lo que el papel que podría desempeñar en el desarrollo y la progresión de lesiones en el epitelio cervical debería de ser estudiado a profundidad. Actualmente, existen vacunas que brindan protección contra este tipo viral (Gardasil-9); sin embargo, las vacunas que se aplican en México no lo incluyen (Cevaxix y Gardasil).

En cuanto a la eversión glandular, aunque este estado es referido habitualmente como normal y que puede llevar a la adquisición de ITS, con nuestros datos se le debería considerar como factor de riesgo para la disbiosis vaginal. Asimismo, debido a que la mayoría de las citocinas no tuvieron una diferencia significativa en presencia o ausencia del VPH, se podría especular que la eversión glandular es un factor adicional que condiciona el microambiente vaginal.

Finalmente, es notable remarcar las limitantes que tuvo este estudio. En primer lugar, en el cuestionario que se proporcionó a las pacientes, no se recabó la información referente a la fecha de la última menstruación ni de la última relación sexual. Estos dos factores pueden influir en los resultados de la secuenciación de la microbiota vaginal. Además, aunque se interrogó acerca de la exposición a infección por Herpes virus (HSV) o VIH, no se realizaron pruebas moleculares que determinaran su presencia. Adicionalmente, el estatus de BV no fue evaluado mediante el sistema de puntuación de Nugent y la medición del pH del MCV.

Como perspectiva, debido a las variaciones en la microbiota entre individuos, sería importante analizar una cohorte más grande, además de realizar un estudio longitudinal. Esto permitiría entender mejor la compleja relación entre la infección por VPH, la microbiota y la respuesta inflamatoria local en el desarrollo y la progresión de lesiones cervicales.

9. Conclusiones

A partir de los datos presentados en este trabajo, se puede corroborar que la eversión glandular podría ser un factor de riesgo para adquirir una infección por VPH además del número de parejas sexuales. Se evidenció que el 56% de las muestras fueron positivas para VPH, de las cuales el 85% contaba con subtipos considerados de alto riesgo. Cabe mencionar que el segundo subtipo con mayor incidencia fue VPH 31; la relevancia de este hallazgo radica en que este tipo viral está estrechamente asociado al desarrollo de cáncer, al igual que VPH 16 y VPH 18.

En cuanto a la detección del VPH en el moco cérvico-vaginal, se probó que la PCR, el ELISA y la MET se pueden utilizar para este fin, aunque con distintos grados de eficacia; con el uso combinado de metodologías se puede obtener un resultado más certero. El empleo rutinario de estas metodologías para la detección de VPH en MCV podría ser una buena herramienta de diagnóstico temprano no invasivo gracias a la facilidad de obtención de la muestra.

Finalmente, con los resultados obtenidos con la secuenciación y la citometría se demostró que la infección por VPH está acompañada de cambios en la microbiota vaginal y el microambiente inflamatorio. Lo cual sugiere que la eversión glandular en conjunto con la inflamación crónica, la infección persistente por VPH y la disbiosis podrían condicionar el desarrollo de lesiones en el endocérvix.

10. Perspectivas

- Evaluar una cohorte más grande y realizar un estudio longitudinal.
- Incluir a mujeres sin eversión glandular para considerarlas controles.
- En el cuestionario sobre factores de riesgo incluir preguntas sobre el nivel socioeconómico, realización de lavados vaginales y el uso terapias de reemplazo hormonal.
- Medir el pH del moco cérvico-vaginal y evaluar la disbiosis mediante la escala de Nugent.
- Realizar pruebas moleculares para la detección de VIH y HSV.

11. Referencias

- Ali, K. S., Ali, H. Y., & Jubrael, J. M. (2012). Concentration levels of IL-10 and TNF α cytokines in patients with human papilloma virus (HPV) DNA⁺ and DNA⁻ cervical lesions. *Journal of immunotoxicology*, 9 (2), 168–172. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2011.642419>.
- An, H. J., Kim, K. R., Kim, I. S., Kim, D. W., Park, M. H., Park, I. A., Suh, K. S., Seo, E. J., Sung, S. H., Sohn, J. H., Yoon, H. K., Chang, E. D., Cho, H. I., Han, J. Y., Hong, S. R. & Ahn, G. H. (2005). Prevalence of human papillomavirus DNA in various histological subtypes of cervical adenocarcinoma: a population-based study. *Modern pathology*, 18(4), 528–534. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800316>.
- Anahitar, M. N., Byrne, E. H., Doherty, K. E., Bowman, B. A., Yamamoto, H. S., Soumillon, M., Padavattan, N., Ismail, N., Moodley, A., Sabatini, M. E., Ghebremichael, M. S., Nusbaum, C., Huttenhower, C., Virgin, H. W., Ndung'u, T., Dong, K. L., Walker, B. D., Fichorova, R. N., & Kwon, D. S. (2015). Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity*, 42(5), 965–976. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.019>.
- Audirac-Chalifour, A., Torres-Poveda, K., Bahena-Román, M., Téllez-Sosa, J., Martínez-Barnetche, J., Cortina-Ceballos, B., López-Estrada, G., Delgado-Romero, K., Burguete-García, A. I., Cantú, D., García-Carrancá, A., & Madrid-Marina, V. (2016). Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS one*, 11 (4), e0153274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153274>
- Bai, L., Yao, N., Qiao, G., Wu, L., & Ma, X. (2020). CXCL5 contributes to the tumorigenicity of cervical cancer and is post-transcriptionally regulated by miR-577. *International journal of clinical and experimental pathology*, 13(12), 2984–2993.
- Behbakht, K., Friedman, J., Heimler, I., Aroutcheva, A., Simoes, J., & Faro, S. (2002). Role of the Vaginal Microbiological Ecosystem and Cytokine Profile in the Promotion of Cervical Dysplasia: A Case–Control Study. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 10(4), 181–186. <https://doi.org/10.1155/s1064744902000200>.
- Bernard, H., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H. & de Villiers, E. (2010). Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments, *Virology*, 401(1), 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>.
- Bhairavabhotla, R. K., Verm, V., Tongaonkar, H., Shastri, S., Dinshaw, K., & Chiplunkar, S. (2007). Role of IL-10 in immune suppression in cervical cancer. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 44(5), 350–356.
- Blioumi, E., Chatzidimitriou, D., Pazartzi, C. h., Katopodi, T., Tzimagiorgis, G., Emmanouil-Nikoloussi, E. N., Markopoulos, A., Kalekou, C., Lazaridis, N., Diza, E., & Antoniadis, D. (2014). Detection and typing of human papillomaviruses (HPV) in malignant, dysplastic, nondysplastic and normal oral epithelium by nested polymerase chain reaction, immunohistochemistry and transitional electron microscopy in patients of northern Greece. *Oral oncology*, 50(9), 840–847. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.06.01>.
- Boccardo, E., Lepique, A. P. & Villa, L. L. (2010). The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 31(11), 1905–1912. <https://doi.org/10.1093/carcin/bqq176>.
- Borgdorff, H., Gautam, R., Armstrong, S. D., Xia, D., Ndayisaba, G. F., van Teijlingen, N. H., Geijtenbeek, T. B., Wastling, J. M. & van de Wijkert, J. H. (2016). Cervicovaginal microbiome

- dysbiosis is associated with proteome changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier. *Mucosal immunology*, 9 (3), 621–633. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.86>.
- Brotman, R. M., Shardell, M. D., Gajer, M. D., Tracy, J. K., Zenilman, J. M., Ravel, J. & Gravitt, P. E. (2014). Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *The journal of infectious diseases*, 210 (11), 1723-1733. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu330>.
- Bruni, L., Diaz, M., Castellsagué, X., Ferrer, E., Bosch, X. & de Sanjosé, S. (2010). Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(12), 1789-1799. <https://doi.org/10.1086/657321>
- Bruni, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Muñoz, J., Bosch, F. X. & de Sanjosé, S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 22 January 2019.
- Buck, C. B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445(1-2), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.038>.
- Burk, R. D., Ho, G. Y., Beardsley, L., Lempa, M., Peters, M., & Bierman, R. (1996). Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *The Journal of infectious diseases*, 174(4), 679–689. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.4.679>.
- Bzhalava, D., Eklund, C. & Dillner, J. (2015). International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 476, 341–344. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.028>.
- Calore, E., José Cavaliere, M., Kasumi Shirata, N., & Araújo, M. F. (1995). Papillomavirus in cervicovaginal smears of women infected with human immunodeficiency virus. *Sao Paulo medical journal*, 113(6), 1009–1011. <https://doi.org/10.1590/s1516-31801995000600002>.
- Caselli, E., D'Accolti, M., Santi, E., Soffritti, I., Conzadori, S., Mazzacane, S., Greco, P., Contini, C., & Bonaccorsi, G. (2020). Vaginal Microbiota and Cytokine Microenvironment in HPV Clearance/Persistence in Women Surgically Treated for Cervical Intraepithelial Neoplasia: An Observational Prospective Study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 540900. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.540900>.
- Castro-Sobrinho, J. M., Rabelo-Santos, S. H., Figueiredo-Alves, R. R., Derchain, S., Sarian, L. O., Pitta, D. R., Campos, E. A. & Zeferino, L. C. (2015). Bacterial Vaginosis and Inflammatory Response Showed Association with Severity of Cervical Neoplasia in HPV-Positive Women. *Diagnostic Cytopathology*, 44 (2), 80-86. <https://doi.org/10.1002/dc>.
- Chandrasekar, B., Melby, P. C., Sarau, H. M., Raveendran, M., Perla, R. P., Marelli-Berg, F. M., Dulin, N. O., & Singh, I. S. (2003). Chemokine-cytokine cross-talk. The ELR+ CXC chemokine LIX (CXCL5) amplifies a proinflammatory cytokine response via a phosphatidylinositol 3-kinase-NF-kappa B pathway. *The Journal of biological chemistry*, 278(7), 4675–4686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207006200>.
- Chen, Y., Qiu, X., Wang, W., Li, D., Wu, A., Hong, Z., Di, W., & Qiu, L. (2020). Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia progression are associated with increased vaginal microbiome diversity in a Chinese cohort. *BMC infectious diseases*, 20 (1), 629. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05324-9>.

- Clifford, G. M., Vaccarella, S., Franceschi, S., Tenet, V., Umulisa, M. C., Tshomo, U., Dondog, B., Vorsters, A., Tommasino, M., Heideman, D. A., Snijders, P. J. F. & Gheit, T. (2016). Comparison of Two Widely Used Human Papillomavirus Detection and Genotyping Methods, GP5+/6+-Based PCR Followed by Reverse Line Blot Hybridization and Multiplex Type-Specific E7-Based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 2031-2038. <https://doi.org/10.1128/JCM.00618-16>
- Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A. & Denny, L. (2019). Cervical Cancer. *The Lancet*, 393, 169-182. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X).
- Comar, M., Iannacone, M. R., Casalicchio, G., McKay-Chopin, S., Tommasino, M., & Gheit, T. (2012). Comparison of hybrid capture II, linear array, and a bead-based multiplex genotyping assay for detection of human papillomavirus in women with negative pap test results and atypical squamous cells of undetermined significance. *Journal of clinical microbiology*, 50(12), 4041-4046. <https://doi.org/10.1128/JCM.02105-12>.
- ortez Hernandez, F. J. (2020). *Evaluación de la presencia y actividad del virus del papiloma humano de alto riesgo en el epitelio glandular cervical* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Crowther, J. R. (2010). *The Elisa guidebook* (2° ed.). Humana Press, Nueva Jersey, Estados Unidos. ISBN: 9781603272544.
- Dallenbach-Hellweg, G., von Knebel Doeberitz, M. & Trunk, M. J. (2006). Normal Histology, Regeneration, and Repair. En *Color atlas of histopathology of the cervix uteri*. pp. 13-31. Springer, Heidelberg, Alemania. ISBN: 9783540251880.
- de Villiers, E., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.
- de Witte, L., Zoughlami, Y., Aengeneyndt, B., David, G., van Kook, Y., Gissman, L. & Geijtenbeek, T. B. H. (2007). Binding of human papilloma virus L1 virus-like particles to dendritic cells is mediated through heparan sulfates and induces immune activation. *Immunobiology*, 212, 679-691. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.09.006>
- Depuydt, C. E., Boulet, G. A., Horvath, C. A., Benoy, I. H., Vereecken, A. J., & Bogers, J. J. (2007). Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(4), 881-891. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00073.x>.
- Di Paola, M., Sani, C., Clemente, A. M., Iossa, A., Perissi, E., Castronovo, G., Tanturli, M., Rivero, D., Cozzolino, F., Cavalieri, D., Carozzi, F., De Filippo, C., & Torcia, M. G. (2017). Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Scientific reports*, 7(1), 10200. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>.
- Ding, Q.; Lu, P.; Xia, Y.; Ding, S.; Fan, Y.; Li, X.; et al. (2016). CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression. *Cancer Medicine*. 5:3246-3259, <https://doi.org/10.1002/cam4.934>.
- Doerflinger, S. Y., Throop, A. L., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2014). Bacteria in the Vaginal Microbiome Alter the Innate Immune Response and Barrier Properties of the Human Vaginal Epithelia in a Species-Specific Manner. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(12), 1989-1999. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu004>.

- Doorbar, J. & Griffin, H. (2019). Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus research*, 7, 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.04.005>
- Dürst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., & zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(12), 3812–3815. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3812>.
- Escamilla-Tilch, M., Filio-Rodríguez, G., García-Rocha, R., Mancilla-Herrera, I., Mitchison, N. A., Ruiz-Pacheco, J. A., Sánchez-García, F. J., Sandoval-Borrego, D., & Vázquez-Sánchez, E. A. (2013). The interplay between pathogen-associated and danger-associated molecular patterns: an inflammatory code in cancer?. *Immunology and cell biology*, 91(10), 601–610. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.58>.
- Eyerich, K., Dimartino, V., & Cavani, A. (2017). IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *European journal of immunology*, 47(4), 607–614. <https://doi.org/10.1002/eji.201646723>.
- Fehrmann, F. & Laimins, L. A. (2003). Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 22, 5201-5207. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206554>.
- Feng, X., Zhang, D., Li, X., Ma, S., Zhang, C., Wang, J., Li, Y., Liang, L., Zhang, P., Qu, Y., Zhang, Z., Yang, Z., Xiang, Y., Zhang, W., Wang, S., Shao, W., & Wang, W. (2018). CXCL5, the upregulated chemokine in patients with uterine cervix cancer, in vivo and in vitro contributes to oncogenic potential of Hela uterine cervix cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 107, 1496–1504. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.149>
- Ferenczy, A., Braun, L., & Shah, K. V. (1981). Human papillomavirus (HPV) in condylomatous lesions of cervix. *The American journal of surgical pathology*, 5(7), 661–670. <https://doi.org/10.1097/00000478-198110000-00008>.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I. & Bray, F. (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. En: <https://gco.iarc.fr/today>.
- Fernandes, J. V., DE Medeiros Fernandes, T. A., DE Azevedo, J. C., Cobucci, R. N., DE Carvalho, M. G., Andrade, V. S., & DE Araújo, J. M. (2015). Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). *Oncology letters*, 9(3), 1015–1026. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2884>.
- Flint, S. J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., Skalka, A. M. & Enquist, L. W. (2015). The Early Host Response: Cell-Autonomous and Innate Immunity. En *Principles of virology* (3° ed., Vol. 2.), pp. 52-97. ASM Press, Washington, DC, Estados Unidos. ISBN: 9781555819347.
- Fujiwara, K., Monk, B. & Devouassoux-Shisheboran, M. (2014). Adenocarcinoma of the Uterine Cervix: Why Is it Different? *Current Oncology Reports*, 16(12), 416-424. <https://doi.org/10.1007/s11912-014-0416-y>.
- Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U. M., Zhong, X., Koenig, S. S., Fu, L., Ma, Z. S., Zhou, X., Abdo, Z., Forney, L. J., & Ravel, J. (2012). Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Science translational medicine*, 4(132), 132ra52. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003605>.

- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E. & Sapp, M. (2001). Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*, 75(3), 1565-1570. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1565-1570.2001>.
- Goodrich, J. K., Di Rienzi, S. C., Poole, A. C., Koren, O., Walters, W. A., Caporaso, J. G., Knight, R., & Ley, R. E. (2014). Conducting a microbiome study. *Cell*, 158(2), 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>.
- Grande, G., Milardi, D., Vincenzioni, F., Pompa, G., Biscione, A., Astorri, A. L., Fruscella, E., De Luca, A., Messina, I., Castagnola, M. & Marana, R. (2015). Proteomic characterization of the qualitative and quantitative differences in cervical mucus composition during the menstrual cycle. *Molecular BioSystems*, 11, 1717-1725. <https://doi.org/10.1039/c5mb00071h>.
- Grover A. & Pandey D. (2017) Anatomy and Physiology of Cervix. En: Mehta S., Sachdeva P. (eds) *Colposcopy of Female Genital Tract*. pp. 3-16. Springer, Singapur. ISBN: 9789811017056.
- Guan, J., Bywaters, S. M., Brendle, S. A., Ashley, R. E., Makhov, A. M., Conway, J. F., Christiensen, N. D. & Hafenstein, S. (2017). Cryoelectron Microscopy Maps of Human Papillomavirus 16 Reveal L2 Densities and Heparin Binding Site. *Structure*, 25(2), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.001>.
- Gupta, V. K., Paul, S., & Dutta, C. (2017). Geography, Ethnicity or Subsistence-Specific Variations in Human Microbiome Composition and Diversity. *Frontiers in microbiology*, 8, 1162. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>.
- Han, L., Taub, R. & Jensen, J. T. (2017). Cervical mucus and contraception: what we know and what we don't. *Contraception*, 96,310-321. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2017.07.168>
- Hedrick Ellenson, L. & Pirog, E. C. (2010). Aparato genital femenino. En Robbins, S. L., Cotran, R. S. *Patología estructural y funcional*. 8ª edición. pp. 1005-1064. Elsevier, Barcelona, España. ISBN:9781416031215.
- Hernández-Rodríguez, C., Romero-González, R., Albani-Campanario, M., Figueroa-Damián, R., Meraz-Cruz, N., & Hernández-Guerrero, C. (2011). Vaginal microbiota of healthy pregnant Mexican women is constituted by four Lactobacillus species and several vaginosis-associated bacteria. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. <https://doi.org/10.1155/2011/851485>.
- Howley, P. M. & Lowy, D. R. (2004). Papillomaviridae. En Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. *Fields virology* 4ª edición. pp. 1777–1833. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, USA. ISBN:9781451105636.
- Hu, B., Fan, H., Lv, X. et al. Prognostic significance of CXCL5 expression in cancer patients: a meta-analysis. *Cancer Cell Int* 18, 68 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0562-7>.
- Huang, X., Li, C., Li, F., Zhao, J., Wan, X., & Wang, K. (2018). Cervicovaginal microbiota composition correlates with the acquisition of high-risk human papillomavirus types. *International journal of cancer*, 143(3), 621–634. <https://doi.org/10.1002/ijc.31342>.
- Husnjak, K., Grce, M., Magdić, L. & Pavelić, K. (2000). Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens.

- Ilhan, Z. E., Łaniewski, P., Thomas, N., Roe, D. J., Chase, D. M., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2019). Deciphering the complex interplay between microbiota, HPV, inflammation and cancer through cervicovaginal metabolic profiling. *EBioMedicine*, 44, 675–690. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.028>.
- International Agency for Research on Cancer, Methods for the detection of HPV infection. (2007). En *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human papillomaviruses*. Vol. 90, pp. 87-112. International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia. ISBN: 9789283212904.
- Iwata, T., Fujii, T., Morii, K., Saito, M., Sugiyama, J., Nishio, H., Morisada, T., Tanaka, K., Yaguchi, T., Kawakami, Y., & Aoki, D. (2015). Cytokine profile in cervical mucosa of Japanese patients with cervical intraepithelial neoplasia. *International journal of clinical oncology*, 20(1), 126–133. <https://doi.org/10.1007/s10147-014-0680-8>.
- Jacobson, D. L., Peralta, L., Graham, N. M. H. & Zenilman, J. (2000). Histologic Development of Cervical Ectopy. *Sexually Transmitted Diseases*, 27(5), 252–258. <https://doi.org/10.1097/00007435-200005000-00003>.
- Jentschke, M., Soergel, P., & Hillemanns, P. (2013). Evaluation of a multiplex real time PCR assay for the detection of human papillomavirus infections on self-collected cervicovaginal lavage samples. *Journal of Virological Methods*, 193(1), 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.05.009>.
- Joyce, J. G., Tung, J., Przysiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. A., Jansen, K. U. & Keller., P. M. (1999). The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 Recombinant Virus-like Particles Interacts with Heparin and Cell-surface Glycosaminoglycans on Human Keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5810-5822. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5810>.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>.
- Kalia, N., Singh, J. & Kaur, M. (2020). Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-020-0347-4>
- Karlsen, F., Kalantari, M., Jenkins, A., Pettersen, E., Kristensen, G., Holm, R., Johansson, B., & Hagmar, B. (1996). Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *Journal of clinical microbiology*, 34(9), 2095–2100.
- Kirjavainen, P. V., Pautler, S., Baroja, M. L., Anukam, K., Crowley, K., Carter, K., & Reid, G. (2009). Abnormal immunological profile and vaginal microbiota in women prone to urinary tract infections. *Clinical and vaccine immunology*, 16(1), 29–36. <https://doi.org/10.1128/CI.00323-08>.
- Kroon, S. J., Ravel, J. & Huston, W. M. (2018). Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertility and sterility*, 110(3), 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.06.036>.

- Lee, V., Tobin, J. M. & Foley, E. (2006). Relationship of cervical ectopy to chlamydia infection in young women. *The journal of family planning and reproductive health care*, 32(2), 104–106. <https://doi.org/10.1783/147118906776276440>.
- Ley, C., Bauer, H. M., Reingold, A., Schiffman, M. H., Chambers, J. C., Tashiro, C. J. & Manos, M. M. (1991). Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(14), 997–1003. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.14.997>.
- Liang, Y., Chen, M., Qin, L., Wan, B. & Wang, H. (2019). A meta-analysis of the relationship between vaginal microecology, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Infectious Agents and Cancer*, 14(29). <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0243-8>.
- Long, D. L., Song, H. L., & Qu, P. P. (2021). Cytokines profiles in cervical mucosa in patients with cervical high-risk human papillomavirus infection. *Journal of infection in developing countries*, 15(5), 719–725. <https://doi.org/10.3855/jidc.12147>.
- Louten, J. & Reynolds, N. (2016). The Immune Response to Viruses. En *Essential human virology*. pp.93-109. Elsevier Academic Press. Londres, Inglaterra. ISBN:9780128009475.
- Machado Junior, L. C., Dalmaso, A. S. W. & Carvalho, H. B. (2008). Evidence for benefits from treating cervical ectopy: literature review. *Sao Paulo Medical Journal*, 126(2), 132–139. <https://doi.org/10.1590/s1516-31802008000200014>
- Marks, M. A., Eby, Y., Howard, R. & Gravitt, P. E. (2012). Comparison of normalization methods for measuring immune markers in cervical secretion specimens. *Journal of Immunological Methods*, 382, 211-215. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.05.012>
- Martin D. H. (2012). The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *The American journal of the medical sciences*, 343(1), 2–9. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31823ea228>
- Mitchell, C., & Marrazzo, J. (2014). Bacterial Vaginosis and the Cervicovaginal Immune Response. *American Journal of Reproductive Immunology*, 71(6), 555–563. <https://doi.org/10.1111/aji.12264>.
- Mitra, A., MacIntyre, D. A., Lee, Y. S., Smith, A., Marchesi, J. R., Lehne, B., Bhatia, R., Lyons, D., Paraskevaidis, E., Li, J. V., Holmes, E., Nicholson, J. K., Bennett, P. R., & Kyrgiou, M. (2015). Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Scientific reports*, 5, 16865. <https://doi.org/10.1038/srep16865>
- Mitra, A., MacIntyre, D. A., Marchesi, J. R., Lee, Y. S., Bennett, P. R. & Kyrgiou, M. (2016). The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where do we go next?. *Microbiome*, 4 (1). <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0203-0>.
- Mitra, A., MacIntyre, D. A., Ntritsos, G., Smith, A., Konstantinos, K., Tsildis, K., Marchesi, J. R., Bennet, P. R., Moscicki, A. & Kyrgiou, M. (2020). The vaginal microbiota associates with the regression of untreated cervical intraepithelial neoplasia 2 lesions. *Nature Communications*, 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15856-y>.
- Molatlhegi, R. P., Liebenberg, L. J., Leslie, A., Noel-Romas, L., Mabhula, A., Mchunu, N., Perner, M., Birse, K., Ngcapu, S., Adamson, J. H., Govender, K., Garrett, N. J., Samsunder, N., Burgener, A. D., Abdool Karim, S. S., Abdool Karim, Q., Passmore, J. S., & McKinnon, L.

- R. (2020). Plasma concentration of injectable contraceptive correlates with reduced cervicovaginal growth factor expression in South African women. *Mucosal immunology*, 13(3), 449–459. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0249-y>.
- Molenaar, M. C., Singer, M. & Ouburg, S. (2018). The two-sided role of the vaginal microbiome in Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalium pathogenesis. *Journal of reproductive immunology*, 130, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.08.006>.
- Moody, C. A. & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10, 550-550. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>.
- Monroy Lagos, O., Aguilar, C., Lizano, M., Cruz-Talonia, F., Cruz, R. M. & Rocha-Zavaleta, L. (2010). Prevalence of human papillomavirus genotypes, and mucosal IgA anti-viral responses in women with cervical ectopy. *Journal of Clinical Virology*, 47, 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.10.008>.
- Monroy Lagos, O. (2017). *Estudio de la Presencia y Potencial Oncogénico del Virus del Papiloma Humano en Eversiones Glandulares del Cérvix* (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Mori, S., Nakao, S., Kukimoto, I., Kusumoto-Matsuo, R., Kondo, K. & Kanda, T. (2011). Biased amplification of human papillomavirus DNA in specimens containing multiple human papillomavirus types by PCR with consensus primers. *Cancer Science*, 102(6), 1223–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01922.x>.
- Netea, M. G., Simon, A., van de Veerdonk, F., Kullberg, B.-J., Van der Meer, J. W. M., & Joosten, L. A. B. (2010). IL-1 β Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. *PLoS Pathogens*, 6(2), e1000661. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000661>.
- Nkili-Meyong, A. A., Moussavou-Boundzanga, P., Labouba, I., Koumakpayi, I. H., Jeannot, E., Descorps-Declère, S., Sastre-Garau, X., Leroy, E. M., Belembaogo, E., & Berthet, N. (2019). Genome-wide profiling of human papillomavirus DNA integration in liquid-based cytology specimens from a Gabonese female population using HPV capture technology. *Scientific reports*, 9(1), 1504. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37871-2>.
- Nogueira-Rodrigues, A., Ferreira, C. G., Bergmann, A., de Aguiar, S. S. & Thuler, L. C. S. (2014). Comparison of adenocarcinoma (ACA) and squamous cell carcinoma (SCC) of the uterine cervix in a sub-optimally screened cohort: A population-based epidemiologic study of 51,842 women in Brazil. *Gynecologic Oncology*, 135(2), 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.08.014>.
- O'Connor, D. M. (2008). Zona de transformación normal. En Apgar, B. S., Brotzman, G. S. & Spitzer, M. (eds), *Colposcopia, principios y práctica: Manual y atlas integrados*. 2ª edición. pp. 125-136. Elsevier, Barcelona, España. ISBN: 9788445812761.
- Ochoa Carrillo, F. J., Guarneros de Regil, D. B., & Velasco Jiménez, M. T. (2015). Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(3), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.gamo.2015.08.002>.
- Olmsted, S. S., Padgett, J. L., Yudin, A. I., Whaley, K. J., Moench, T. R., & Cone, R. A. (2001). Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. *Biophysical journal*, 81(4), 1930–1937. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75844-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75844-4).

- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P. & Muñoz, R. B. (2014). Activación, diferenciación y memoria de células T. En *Kuby: Inmunología* (7° ed.). pp. 357-384. McGraw-Hill Interamericana, Ciudad de México, México. ISBN: 978607151126-3.
- Pang, X., Zhang, Y., Wei, H., Zhang, J., Luo, Q., Huang, C., & Zhang, S. (2014). Expression and effects of high-mobility group box 1 in cervical cancer. *International journal of molecular sciences*, 15(5), 8699–8712. <https://doi.org/10.3390/ijms15058699>.
- Pirog, E. C., Kleter, B., Olgac, S., Bobkiewicz, P., Lindeman, J., Quint, W. G., Richart, R. M. & Isacson, C. (2000). Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*, 157(4), 1055–1062. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64619-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64619-6).
- Prediville, W. & Sankaranarayanan, R.(2017). *Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia. ISBN: 9789283224587
- Raff, A. B., Woodham, A. W., Raff, L. M., Skeate, J. G., Da Silva, D. M., Schelhaas, M. & Kast, W. M. (2013). The Evolving Field of Human Papillomavirus Receptor Research: a Review of Binding and Entry. *Journal of Virology*, 87(11), 6062-6072. <https://doi.org/10.1128/JVI.0033013>.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., & Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (Suppl 1), 4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
- Remmerbach, T. W., Brinckmann, U. G., Hemprich, A., Chekol, M., Kühndel, K., & Liebert, U. G. (2004). PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *Journal of Clinical Virology*, 30(4), 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2003.12.011>.
- Rocha-Zavaleta, L., Yescas, G., Cruz, R, M. & Cruz-Talonia, F. (2004). Human papillomavirus infection and cervical ectopy. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 85, 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2003.10.002>.
- Roden, R. B. S. & Stern, P. L. (2018). Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18, 240-254. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.13>.
- Rodriguez-Cerdeira, C., Sanchez-Blanco, E., & Alba, A. (2012). Evaluation of Association between Vaginal Infections and High-Risk Human Papillomavirus Types in Female Sex Workers in Spain. *ISRN obstetrics and gynecology*, 2012, 240190. <https://doi.org/10.5402/2012/240190>.
- Romero-Morelos, P., Bandala, C., Jiménez-Tenorio, J., Valdespino-Zavala, M., Rodríguez-Esquivel, M., Gama-Ríos, R. A., Bandera, A., Mendoza-Rodríguez, M., Taniguchi, K., Marrero-Rodríguez, D., López-Romero, R., Ramón-Gallegos, E., & Salcedo, M. (2019). Vaginosis-associated bacteria and its association with HPV infection. *Medicina clinica*, 152(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.01.027>.
- Rommel, O., Dillner, J., Fligge, C., Bergsdorf, C., Wang, X., Selinka, H. & Sapp, M. (2005). Heparan Sulfate Proteoglycans Interact Exclusively With Conformationally Intact HPV L1

- Assemblies: Basis for a Virus-Like Particle ELISA. *Journal of Medical Virology*, 75, 114-121. <https://doi.org/10.1002/jmv.20245>
- Roset Bahmanyar, E., Paavonen, J., Naud, P., Salmerón, J., Chow, S. N., Apter, D., Kitchener, H., Castellsagué, X., Teixeira, J. C., Skinner, S. R., Jaisamram, U., Limson, G. A., Garland, S. M., Szarewski, A., Romanowski, B., Aoki, F., Schwarz, T. F., Poppe, W. A., De Carvalho, N. S., Harper, D. M. (2012). Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in young adult women at enrolment in the multinational PATRICIA trial. *Gynecologic oncology*, 127(3), 440–450. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.08.033>.
- Ross, M. H. & Wojciech, P. (2016). Sistema genital femenino. En *Histología: Texto y atlas: Correlación con biología celular y molecular*. 7ª edición, pp. 897-963. Wolters Kluwer, Barcelona, España. ISBN:9788416004966.
- Ruba, S., Schoolland, M., Allpress, S. & Sterrett, G. (2004). Adenocarcinoma in Situ of the Uterine Cervix, Screening and Diagnostic Errors in Papanicolaou Smears. *Cancer Cytopathology*, 102(5), 280-287. <https://doi.org/10.1002/cncr.20600>.
- Sabihi, M., Böttcher, M., Pelczar, P., & Huber, S. (2020). Microbiota-Dependent Effects of IL-22. *Cells*, 9(10), 2205. <https://doi.org/10.3390/cells9102205>.
- Sarrazin, S., Lamanna, W. C. & Esko, J. E. (2011). Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952>.
- Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., de Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., Stanley, M. A. & Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16086, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>
- Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T., Pawlita, M., Tommasino, M., & Gheit, T. (2010). Abundance of multiple high-risk human papillomavirus (HPV) infections found in cervical cells analyzed by use of an ultrasensitive HPV genotyping assay. *Journal of clinical microbiology*, 48(1), 143–149. <https://doi.org/10.1128/JCM.00991-09>.
- Sellers, J. W. & Sankaranarayanan, R. (2003). *Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia a beginner's manual*. pp. 1-30. IARC Press, Lyon, Francia. ISBN: 9789283204121.
- Senba, M., & Mori, N. (2012). Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncology reviews*, 6(2), e17. <https://doi.org/10.4081/oncol.2012.e17>.
- Shannon, B., Yi, T. J., Perusini, S., Gajer, P., Ma, B., Humphrys, M. S., Thomas-Pavanel, J., Chieza, L., Janakiram, P., Saunders, M., Tharao, W., Huibner, S., Shahabi, K., Ravel, J., Rebbapragada, A. & Kaul, R. (2017). Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. *Mucosal Immunology*, 10 (5), 1310-1319. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.129>.
- Shikova, E., Todorova, I., Ganchev, G., & Kouseva-Dragneva, V. (2009). Detection and Typing of Human Papillomaviruses by PCR. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23, 877-880. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818562>
- Singer, A. & Jordan, J. A. (2006). The functional anatomy of the cervix, the cervical epithelium and the stroma. En: *The Cervix*. 2ª edición. pp. 3-12. Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 9781405131377.

- Smith, J. S., Green, J., Berrington de Gonzalez, A., Appleby, P., Peto, J., Plummer, M., Franceschi, S., & Beral, V. (2003). Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *The Lancet*, 361, 1159–1167. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)129492](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)129492).
- Spolski, R., & Leonard, W. J. (2014). Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(5), 379–395. <https://doi.org/10.1038/nrd4296>.
- Soares, L. C., Braz, F., Araújo, A. R. & Oliveira, M. (2019). Association of Sexually Transmitted Diseases With Cervical Ectopy: A Systematic Review. *Sexually transmitted diseases*, 46 (7), 452–457. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000992>.
- Souza, J. M., Matias, B. F., Rodrigues, C. M., Murta, E. F., & Michelin, M. A. (2013). IL-17 and IL-22 serum cytokine levels in patients with squamous intraepithelial lesion and invasive cervical carcinoma. *European journal of gynaecological oncology*, 34(5), 466–468.
- Stanley, M. (2010). Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology*, 117, s5-s10. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.024>.
- Steinbach, A. & Riemer, A. B. (2018). Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *International Journal of Cancer*, 142, 224-229. <https://doi.org/10.1002/ijc.31027>.
- Stricker, T. P. & Kumar, V. (2010). Neoplasias. En Robbins, S. L., Cotran, R. S. *Patología estructural y funcional*. 8ª edición. pp. 259-330. Elsevier, Barcelona, España. ISBN:9781416031215.
- Taherali, F., Varum, F. & Basit, A. W. (2018). A slippery slope: On the origin, role and physiology of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 124, 16-33. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.10.014>.
- Tamarelle, J., Thiébaud, A. C. M., Barbeyrac, B., Bébéar, C., Ravel, J. & Delarocque-Astagneau, E. (2019). The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 25, 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.019>.
- Tatti, S. A., Fleider, L. A., & Tinnirello, M. de los Á. (2011). *Colposcopia y patologías del tracto genital inferior: en la era de la vacunación*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. ISBN: 9789500604970.
- Tindle, R. W. (2002). Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2, 59-64. <https://doi.org/10.1038/nrc700>.
- Tjong, M.Y., van der Vange, N., ten Kate F.J., Tjong-A-Hung, S. P., ter Schegget, J., Burger, M. P. & Out, T. A. (1999) Increased IL-6 and IL-8 levels in cervicovaginal secretions of patients with cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 73 (2), 285–291. <https://doi.org/10.1006/gyno.1999.5358>.
- Toki, T., Oikawa, N., Tase, T., Sato, S., Wada, Y., Yajima, A., & Higashiiwai, H. (1986). Immunohistochemical and electron microscopic demonstration of human papillomavirus in dysplasia of the uterine cervix. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 149(2), 163–167. <https://doi.org/10.1620/tjem.149.163>.
- Toon, P. G., Arrand, J. R., Wilson, L. P. & Sharp, D. S. (1986). Human papillomavirus infection of the uterine cervix of women without cytological signs of neoplasia. *British Medical Journal*, 293 (6557), 1261–1264. <https://doi.org/10.1136/bmj.293.6557.1261>.

- Torcia M. G. (2019). Interplay among Vaginal Microbiome, Immune Response and Sexually Transmitted Viral Infections. *International journal of molecular sciences*, 20 (2), 266. <https://doi.org/10.3390/ijms20020266>.
- Torres-Poveda, K., Ruiz-Fraga, I., Madrid-Marina, V., Chavez, M., & Richardson, V. (2019). 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*, 19(1), 1205. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6388-4>.
- Umezawa, T., Umemori, M., Horiguchi, A., Nomura, K., Takahashi, H., Yamada, K., Ochiai, K., Okamoto, A., Ikegami, M., & Sawabe, M. (2015). Cytological variations and typical diagnostic features of endocervical adenocarcinoma in situ: A retrospective study of 74 cases. *CytoJournal*, 12, 8. <https://doi.org/10.4103/17426413.156081>.
- Vaccarella, S., Franceschi, S., Herrero, R., Muñoz, N., Snijders, P. J., Clifford, G. M., Smith, J. S., Lazcano-Ponce, E., Sukvirach, S., Shin, H. R., de Sanjosé, S., Molano, M., Matos, E., Ferreccio, C., Anh, P. T., Thomas, J. O., Meijer, C. J., & IARC HPV Prevalence Surveys Study Group (2006). Sexual behavior, condom use, and human papillomavirus: pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 15(2), 326–333. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0577>.
- van der Horst, J., Siebers, A. G., Bulten, J., Massuger, L. F., & de Kok, I. M. (2017). Increasing incidence of invasive and in situ cervical adenocarcinoma in the Netherlands during 2004-2013. *Cancer medicine*, 6(2), 416–423. <https://doi.org/10.1002/cam4.971>.
- Van Der Pol, W. J., Kumar, R., Morrow, C. D., Blanchard, E. E., Taylor, C. M., Martin, D. H., Lefkowitz, E. J., & Muzny, C. A. (2019). In Silico and Experimental Evaluation of Primer Sets for Species-Level Resolution of the Vaginal Microbiota Using 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing. *The Journal of infectious diseases*, 219(2), 305–314. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy508>.
- Venkatesh, K. K. & Cu-Uvin, S. (2013). Assessing the relationship between cervical ectopy and HIV susceptibility: implications for HIV prevention in women. *American Journal of Reproductive Immunology*, 69 Suppl 1, 68–73. <https://doi.org/10.1111/aji.12029>.
- Veress, G., Csiky-Mészáros, T., Czeglédy, J., & Gergely, L. (1992). Oral contraceptive use and human papillomavirus infection in women without abnormal cytological results. *Medical microbiology and immunology*, 181(4), 181–189. <https://doi.org/10.1007/BF00215764>.
- Vojtechova, Z., Sabol, I., Salakova, M., Turek, L., Grega, M., Smahelova, J., Vencalek, O., Lukesova, E., Klozar, J., & Tachezy, R. (2016). Analysis of the integration of human papillomaviruses in head and neck tumours in relation to patients' prognosis. *International journal of cancer*, 138(2), 386–395. <https://doi.org/10.1002/ijc.29712>.
- Wagner, B. D., Grunwald, G. K., Zerbe, G. O., Mikulich-Gilbertson, S. K., Robertson, C. E., Zemanick, E. T., & Harris, J. K. (2018). On the Use of Diversity Measures in Longitudinal Sequencing Studies of Microbial Communities. *Frontiers in microbiology*, 9, 1037. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01037>.
- Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J. J., Peto, J., Meijer, C. J. L. M. & Muñoz, N. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189, 12–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F).

- Walz, A., Schmutz, P., Mueller, C., & Schnyder-Candrian, S. (1997). Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *Journal of leukocyte biology*, 62(5), 604–611. <https://doi.org/10.1002/jlb.62.5.604>.
- Wang, Y., Springer, S., Mulvey, C. L., Silliman, N., Schaefer, J., Sausen, M., James, N., Retting, E. M., Guo, T., Pickering, C. R., Bishop, J. A., Chung, C. H., Califano, J. A., Eisele, D. W., Fakhry, C., Gourin, C. G., Ha, P. K., Kang, H., Kiess, A., Koch, W.... & Agrawal, N. (2015). Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Science Translational Medicine*, 7(293), 293ra104. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa8507>.
- Watts, D. H., Fazzari, M., Minkoff, H., Hillier, S. L., Sha, B., Glesby, M., Levine, A. M., Burk, R., Palefsky, J. M., Moxley, M., Ahdieh-Grant, L., & Strickler, H. D. (2005). Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. *The Journal of infectious diseases*, 191(7), 1129–1139. <https://doi.org/10.1086/427777>.
- Weismiller, D. G. (2008). Colposcopia durante el embarazo. En Apgar, B. S., Brotzman, G. S. & Spitzer, M. (eds), *Colposcopia, principios y práctica: Manual y atlas integrados*. 2ª edición. pp. 411–436. Elsevier, Barcelona, España. ISBN: 9788445812761.
- WHO. (2006). *Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice*. World Health Organization, Ginebra, Suiza. ISBN: 9789241547000.
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in microbiology*, 10, 2407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>.
- Yasuda, K., Nakanishi, K., & Tsutsui, H. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 649. <https://doi.org/10.3390/ijms20030649>.
- Zhang, W., Tian, X., Mumtahana, F., Jiao, J., Zhang, T., Croce, K. D., Ma, D., Kong, B., & Cui, B. (2015). The existence of Th22, pure Th17 and Th1 cells in CIN and Cervical Cancer along with their frequency variation in different stages of cervical cancer. *BMC cancer*, 15, 717. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1767-y>.
- Zhi, W., Ferris, D., Sharma, A., Purohit, S., Santos, C., He, M., Ghamande, S., & She, J. X. (2014). Twelve serum proteins progressively increase with disease stage in squamous cell cervical cancer patients. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 24(6), 1085–1092. <https://doi.org/10.1097/IGC.000000000000153>.
- zur Hausen, H. (1976). Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer. *Cancer Research*, 36, 794.
- zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews. Cancer*, 2(5), 342–350. <https://doi.org/10.1038/nrc798>.

12. Anexos

1. Soluciones

PBS 1X

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

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

TBE 1X

Tris-Base	5.45 g
Ácido Bórico	2.78 g
EDTA	0.37 g

Diluir en 800 ml de agua destilada, ajustar pH a 8 y aforar a 1 L.

TBS 1X

Tris-HCl	6.05 g
NaCl	8.76 g

Diluir en 800 ml de agua destilada, ajustar pH a 7.5 y aforar a 1 L.

2. Abundancia relativa a nivel *phylum*

Filum	VPH -	VPH 16	VPH 18	VPH 31
p_Actinobacteria	17.95%	27.60%	39.79%	15.31%
p_Bacteroidetes	3.49%	4.31%	5.20%	5.28%
p_Firmicutes	71.64%	47.81%	50.07%	49.51%
p_Fusobacteria	0.6%	3.35%	3.09%	16.03%
p_Proteobacteria	6.32%	16.93%	1.85%	13.87%

Tabla 6. Abundancia relativa a nivel *phylum* por tipo viral.

3. Abundancia relativa a nivel género

Genero	VPH neg	VPH 16	VPH 18	VPH 31
g_Aerococcus	0.089%	0.189%	0.001%	0.015%
g_Agrobacterium	0.092%	0.000%	0.025%	0.877%
g_Alloscardovia	1.298%	0.000%	0.004%	0.000%
g_Anaerococcus	1.185%	1.063%	0.035%	2.304%
g_Arcanobacterium	0.139%	0.289%	0.277%	0.020%
g_Atopobium	2.174%	10.994%	3.350%	10.544%

g_Clostridium	0.028%	0.001%	0.000%	1.219%
g_Dialister	0.063%	0.142%	0.015%	0.189%
g_Finegoldia	0.012%	0.172%	0.009%	0.013%
g_Fusobacterium	0.014%	0.000%	0.010%	0.815%
g_Gardnerella	14.144%	16.048%	35.996%	3.731%
g_Gemella	0.031%	0.024%	0.000%	0.033%
g_Lactobacillus	67.415%	40.702%	42.019%	36.933%
g_Megasphaera	0.033%	2.007%	0.181%	2.066%
g_Mobiluncus	0.008%	0.044%	0.001%	0.910%
g_Moryella	0.035%	0.129%	0.003%	0.082%
g_Mycoplasma	0.231%	0.086%	0.003%	0.024%
g_Ochrobactrum	0.169%	0.798%	0.068%	1.407%
g_Parvimonas	0.059%	0.509%	0.604%	0.640%
g_Peptococcus	0.044%	0.064%	0.000%	0.028%
g_Peptoniphilus	0.183%	0.588%	0.207%	0.342%
g_Peptostreptococcus	0.217%	0.549%	0.001%	0.914%
g_Porphyrmonas	0.053%	0.114%	0.001%	0.151%
g_Prevotella	3.431%	4.059%	5.184%	5.216%
g_Pseudomonas	0.740%	16.642%	0.040%	9.941%
g_Shuttleworthia	0.028%	0.048%	0.151%	2.131%
g_Sneathia	0.584%	3.459%	3.092%	15.896%
g_Stenotrophomonas	5.302%	0.022%	1.691%	2.024%
g_Streptococcus	1.822%	0.944%	6.600%	1.448%
g_Ureaplasma	0.376%	0.313%	0.432%	0.089%

Tabla 7. Abundancia relativa a nivel género por tipo viral.