

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**



**Estudio de la Asociación de Genotipos del Virus
del Papiloma Humano con *Chlamydia
trachomatis* y otros Gérmenes en Pacientes con
Fallo Reproductivo**

TESIS DOCTORAL

Adriana Guadalupe Ancer Arellano

**Directores: Dra. María Guadalupe Gallegos Ávila
Dr. David Hardisson Hernández**

Madrid, 2016



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



MARÍA GUADALUPE GALLEGOS ÁVILA, PROFESORA TITULAR DE BIOLOGÍA CELULAR Y DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, COORDINADORA DE LA SECCIÓN DE PATOBIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, MONTERREY, MÉXICO,

CERTIFICA QUE: Dña. **Adriana Guadalupe Ancer Arellano**, Licenciada en Medicina y Médico Especialista en Anatomía Patológica, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación **“Estudio de la asociación de genotipos del virus del papiloma humano con *Chlamydia trachomatis* y otros gérmenes en pacientes con fallo reproductivo”**, estudio que considero completamente satisfactorio para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid

Monterrey, 4 de abril de 2016

Fdo. María Guadalupe Gallegos Ávila





DAVID ALONSO HARDISSON HERNÁNDEZ, PROFESOR TITULAR DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID,

CERTIFICA QUE: Dña. **Adriana Guadalupe Ancer Arellano**, Licenciada en Medicina y Médico Especialista en Anatomía Patológica, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación **“Estudio de la asociación de genotipos del virus del papiloma humano con *Chlamydia trachomatis* y otros gérmenes en pacientes con fallo reproductivo”**, estudio que considero completamente satisfactorio para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 4 de abril de 2016

Fdo. David Hardisson Hernández

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. **María Guadalupe Gallegos Ávila** y al Dr. **David Hardisson Hernández**, por la dirección y corrección de este trabajo de Tesis. Sus enseñanzas científicas y su calidad humana han sido para mí de gran valor.

Al Dr. **José Javier Sánchez Hernández**, por su generosa asesoría en la evaluación estadística de los datos de este trabajo de Tesis Doctoral y la lectura y revisión de todo el documento.

Al Dr. **Alberto Niderhauser García**, por alentarme en la realización de este proyecto y transmitirme sus conocimientos; además, ante todo, por brindarme su amistad.

Al Dr. **Salomón Álvarez Cuevas**, por su generosa asesoría y valiosa colaboración para la realización de este trabajo.

A todos mis amigos y colaboradores del **Departamento de Patología** de la Facultad de Medicina de la UANL, que contribuyeron con su dedicación y esfuerzo a la elaboración de esta Tesis.

Al Dr. **Javier Regadera**, especialmente por su labor de gestión como Tutor del Programa de Intercambio Académico UANL-UAM.

DEDICATORIA:

A mi esposo, **Huemack Eduardo Rivera Zapata**,
por apoyarme, acompañarme y tener fe en mí y en todos mis proyectos.

A mis hijos, **Adrián y Eduardo Rivera Ancer**,
por ser mi mayor motivo para mejorar cada día como madre, como profesionalista
y como ser humano.

A mis padres, **Jesús Ancer Rodríguez y María Guadalupe Arellano de Ancer**,
por ser mis guías, apoyo y un gran ejemplo a lo largo de mi vida.

A mis hermanos, **Claudia y Jesús Ancer Arellano**,
por ser mis compañeros de sueños y apoyarme siempre.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	<i>iii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>iv</i>
ABREVIATURAS	<i>vii</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 GENERALIDADES DE LA INFECCION POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)	2
1.1.1 <i>Epidemiología e Historia Natural. Transmisión de la Infección por VPH</i>	2
1.1.2 <i>Etiología y patogenia de la infección por VPH</i>	5
1.1.3 <i>Estructura Básica del Genoma</i>	7
1.1.4 <i>Clasificación de los VPH. Tipos, Subtipos y Variantes. Relación con la Patología</i>	8
1.1.5 <i>Biología del VPH. Progresión Natural de la Enfermedad, Infección Latente e Infección Productiva</i>	10
1.1.6 <i>Interacción Virus Huésped. Inmunidad de la Infección VPH</i>	11
1.1.7 <i>Mecanismos de Oncogénesis. Regulación del Ciclo Celular</i>	12
1.2 VPH Y CÁNCER: PATOLOGÍA CLÍNICA	16
1.2.1 <i>Formas de Expresión de la Infección por el Virus del Papiloma Humano</i>	16
1.2.2 <i>Lesiones Clínicas y Lesiones Subclínicas</i>	17
1.2.3 <i>Diagnóstico: Citología, Colposcopia, Pruebas Moleculares y sus Aplicaciones Clínicas</i>	18
1.3 INFERTILIDAD POR FACTOR INFECCIOSO	19
1.3.1 <i>Definición y Frecuencia</i>	19
1.3.2 <i>Infecciones Genitourinarias y Gérmenes Asociados a la Infertilidad</i>	20
1.3.3 <i>Mycoplasma sp y Ureaplasma Urealyticum</i>	21
1.3.4 <i>Chlamydia Trachomatis, Prevalencia y Patologías Inflamatorias Asociadas</i>	22
1.3.5 <i>Importancia de la Chlamydia Trachomatis en el Cáncer Cervical</i>	25
1.3.6 <i>Asociación de la Infertilidad con la Infección por VPH</i>	26
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
3 MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1 MATERIAL	32
3.1.1 <i>Casos Incluidos en el Estudio</i>	32
3.1.2 <i>Número de Pacientes, Base de Datos y Confidencialidad</i>	33
3.1.3 <i>Historia Clínica</i>	34
3.1.4 <i>Muestras Biológicas</i>	34

3.2	MÉTODOS	34
3.2.1	<i>Detección de Chlamydia en Muestras de Exudado Cérvico-Vaginal</i>	34
3.2.2	<i>Detección de Mycoplasma sp. en Muestras de Exudado Cérvico-Vaginal</i>	35
3.2.3	<i>Detección Molecular del Virus del Papiloma Humano en Muestras de Exudado Cérvico-Vaginal</i>	37
3.2.3.1	Detección Molecular del Virus del Papiloma Humano en Muestras de Exudado Cérvico-Vaginal Mediante PCR-Multiplex	37
3.2.3.2	Detección Molecular del Virus del Papiloma Humano de los Exudados Cérvico – Vaginal por PCR – Dual Priming Olinucleotide (DPO)	39
3.2.3.3	Detección Molecular del Virus del Papiloma Humano Mediante la Técnica de Hibridación con Sondas Oligoespecíficas	40
3.2.4	Análisis Estadístico	41
3.2.4.1	Estadística Descriptiva	42
3.2.4.2	Inferencia Estadística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	PACIENTES SELECCIONADAS	44
4.2	RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	45
4.3	DATOS CLÍNICOS	47
4.3.1	<i>Antecedentes Ginecológicos</i>	47
4.3.2	<i>Antecedentes Reproductivos</i>	52
4.3.3	<i>Datos Clínicos y Exploración Física</i>	52
4.4	RESULTADOS DEL GENOTIPADO DEL VPH	66
4.4.1	<i>Distribución de Diferentes Genotipos de VPH en las Pacientes</i>	66
4.4.2	<i>Asociación entre Genotipos de VPH de Alto y Bajo Riesgo</i>	69
4.4.3	<i>Coinfección por VPH y Bacterias en la IGU</i>	71
4.4.4	<i>Infeción por VPH y Datos Clínicos Asociados</i>	73
4.4.5	<i>Asociación entre la IGU, el VPH y la Pérdida Gestacional</i>	75
4.4.6	<i>Asociación entre la IGU, el VPH y Tratamientos de Reproducción Asistida</i>	76
5	DISCUSIÓN	80
6	CONCLUSIONES	108
7	RESUMEN	110
8	SUMMARY	113
9	REFERENCIAS	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Descripción de pacientes	47
Tabla II.	Motivo de consulta y hábitos de riesgo para ITS	48
Tabla III.	Antecedentes ginecológicos clínicos y quirúrgicos	50
Tabla IV.	Tratamientos de reproducción asistida y pérdidas gestacionales	53
Tabla V.	Signos y síntomas de infección genitourinaria	55
Tabla VI.	Datos de la exploración del cérvix	61
Tabla VII.	Datos del orificio externo y canal cervical	63
Tabla VIII.	Datos de la exploración física vaginal	65
Tabla IX.	Presencia de lesiones papilomatosas	66
Tabla X.	Distribución de genotipos del Virus del Papiloma Humano	69
Tabla XI.	Presencia de otros gérmenes y asociación al VPH en pacientes infértiles	73
Tabla XII.	Asociación entre el VPH y el aborto	76
Tabla XIII.	Asociación entre el VPH y el resultado de la reproducción asistida	78
Tabla XIV.	Factores de riesgo para adquisición y transmisión del VPH	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1A.	Inserción del Virus y características de la progresión natural de la infección (Banks <i>et al.</i> , 2012)	6
Figura 1B.	Progresión natural de la infección por VPH: distintas fases y cambios morfológicos (von Knebel-Doerberitz <i>et al.</i> , 1994)	6
Figura 2.	Interacción de la infección por VPH con la respuesta del huésped (zur Hausen, 2002). La mayoría de los mecanismos con los que el VPH suprime la respuesta inmune se basan en la reducción de la expresión de los genes que codifican proteínas para dicha respuesta mediante la expresión preferencial por parte de la célula de las proteínas E6 y E7 del VPH	14
Figura 3.	Interacción de la infección por VPH con la respuesta del huésped (zur Hausen, 2002). La expresión de las proteínas E6 y E7 en las capas granular y espinosa del epitelio; en ellas se inicia la diferenciación y se origina el cambio morfológico de las células epiteliales que forman coilocitos, células patognomónicas de la infección	15
Figura 4.	Actividades oncogénicas y funciones cooperativas entre las proteínas E6/E7 del VPH (zur Hausen, 2002). Efecto sinérgico para inmortalizar a las células	16
Figura 5.	Esquema del genoma del VPH señalando la región utilizada para su detección y genotipificación (Muñoz <i>et al.</i> , 2006)	41
Figura 6.	Distribución de microorganismos diagnosticados en el exudado cérvico vaginal	46
Figura 7.	Detección de <i>C. trachomatis</i> con anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína (verde amarillento) contrastados con azul de Evans. Microscopia de Fluorescencia, 63x	46
Figura 8.	Identificación microbiológica de <i>Ureaplasma urealyticum</i> en exudado cérvico vaginal y endocervical, Cultivo positivo para <i>U. urealyticum</i> . Sistema de identificación bioquímica "Mycoplasma IST 2". Abajo: Identificación del gen de <i>Ureaplasma urealyticum</i> en líquido de la cavidad uterina, en una paciente infértil, con VPH 6 y 16 y <i>C. trachomatis</i> en el exudado cervical	47
Figura 9.	Histerosalpingografías de dos pacientes de este estudio, con obstrucción tubárica unilateral en la imagen de la izquierda y bilateral en la de la derecha, en ésta además se aprecian sinequias uterinas (flechas), como secuelas cicatriciales de la infección uterina crónica asociadas a subfertilidad	49
Figura 10.	A, B y C: Células epiteliales con inclusiones bacterianas, observación citológica en fresco. En A tinción con eosina Y. En B y C: Coilocitos, tinción con rojo neutro. En D a G: imágenes representativas de citología con tinción de Papanicolaou en base líquida. La presencia de bacterias intracelulares se indica con flechas	51

Figura 11. Paciente de 34 años de edad con antecedente de 5 IUI y 3 FIV/ICSI. Fue referida para atención de IGU recurrentes y resistente a tratamientos, un año después de haber sido hysterectomizada Colposcopia anormal (A), Coilocitos en una lesión CIN I (B), Lesión en cúpula vaginal (C). Los VPH 18, 35, 39, 51, 56, 66 y 74 se detectaron en la secreción del fondo de saco vaginal (D).	52
Figura 12. Síntomas y signos de infección genitourinaria	54
Figura 13. En la fila superior y media, cepillo citológico con secreción tomada del conducto cervical. En la primera fila se muestra la consistencia hiperviscosa o filante de una secreción semitransparente amarillenta y de aspecto hemático obtenida del conducto cervical. Las imágenes de la fila media e inferior muestran el tipo de secreción encontrada en la endocervicitis y endometritis: un moco de color café claro a oscuro presente con mayor frecuencia en el período perimenstrual (92,7%) y periovulatorio (51,9%)	56
Figura 14. Características del sangrado menstrual: apariencias cualitativas	57
Figura 15. Características del sangrado menstrual: síntomas y signos asociados	59
Figura 16. Cervicitis crónica hipertrófica con erosión superficial. Se observan pápulas, de 2 a 3 mm de diámetro múltiples eritematosas (*) y Quiste de Naboth (QN). En las paredes vaginales se observan crecimientos papilares (fechas). La paciente de 34 años, con diagnóstico inicial de IGU por C. trachomatis y U. urealyticum en ambos cónyuges, resultó positiva en la prueba de VPH (genotipos 16 y 18). El motivo de su consulta fue infertilidad primaria con antecedente de 8 IUI fallidas de causa no explicada	60
Figura 17. Cervicitis crónica. De izquierda a derecha se observan: un pólipo en el OECU, observado en una paciente con infertilidad primaria; tejido de granulación en el OECU, erosión de la SECU y sangrado del conducto cervical en las pacientes con IGU crónica, pérdidas gestacionales y fracaso en tratamientos de reproducción asistida	62
Figura 18. Leucorrea: secreción vaginal blanca amarillenta, mucosa abundante referida en el interrogatorio clínico y presente en la exploración vaginal en un alto porcentaje de las pacientes de éste estudio. En la imagen de la izquierda se aprecia la procedencia de la mucosidad desde el conducto cervical. En la imagen de la derecha la secreción es cristalina y la superficie externa del cuello uterino presenta inflamación	62
Figura 19. Exploración vaginal: características del cuello uterino	64
Figura 20. Formaciones papilares múltiples observadas en el 35,6% de las pacientes de este estudio. (A) En la pared vaginal; (B) Cérvix uterino hipertrófico inflamado y (C) sangrado del conducto cervical; (D) papilomas o verrugas perianales	66
Figura 21. Pacientes con al menos un genotipo de VPH positivo. Las barras representan los VPH de riesgo alto	67
Figura 22. Distribución de genotipos de VPH de alto y bajo riesgo	68

Figura 23a. Cuerpos elementales fluorescentes en una célula del ECV de una paciente con ICP; los cultivos bacterianos fueron negativos	68
Figura 23b. Electroforesis en gel de agarosa para detección de <i>C. Trachomatis</i> . L: Marcador de PM (100 pb), 1: Control (-), 2: Control (+), 3-11: paciente sin infección, 12: paciente infectada	68
Figura 24. PCR Multiplex. Positivos para la banda VPH 18: banda de 475 pb y VPH 6: banda de 184 pb. La combinación de VPH 6 con VPH de alto riesgo se encontró en 50,9% de las muestras positivas para VPH en este trabajo	70
Figura 25. Número de casos con al menos dos genotipos de VPH encontrados en las muestras de exudado cérvico vaginal de las pacientes incluidas en este estudio	71
Figura 26. Ejemplos de los resultados de pacientes de este estudio con infecciones multimicrobianas	74
Figura 27. Identificación del ADN de VPH por PCR en muestras del exudado cérvico vaginal de algunas de las pacientes de este estudio. Se indica el control de peso molecular de β -globina (β)	79

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ASC-US:	Células escamosas atípicas de significado incierto
C:	Chlamydia
CC:	Cáncer(es) cervical (es)
CCA:	Adenocarcinoma cervical
CCS:	Carcinoma de células escamosas
CDC:	Center for Disease Control
CE:	Cuerpos Elementales
<i>Ct:</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DPO:	Dual priming oligonucleotide
ECV:	Exudado cérvico vaginal
EPI:	Enfermedad Pélvica Inflamatoria
ETS:	Enfermedades de transmisión sexual
FIV:	Fertilización in vitro
HSIL:	Lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado
HyE:	Hematoxilina y Eosina
ICP:	Infertilidad conyugal primaria
ICSI:	Inyección intracitoplásmica de espermatozoides
IFD:	Inmunofluorescencia Directa
IGU:	Infección genitourinaria
IUI:	Inseminación intrauterina
INEGI:	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ITS:	Infección de Transmisión Sexual
IVSA:	Inicio vida sexual activa
LSIL:	Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado
L ₁ :	Lipoproteína 1
M:	Mycoplasma
M:	Molar
MALT:	Tejido Linfático Asociado a Mucosas
MOMP:	Proteína Mayor de Membrana Externa

Pap:	Citología de Papanicolaou
PBS:	Buffer Salino de Fosfatos
PCR:	Polimerase Chain Reaction
pH:	Potencial de hidrógeno
Rpm:	Revoluciones por minuto
SC:	Sociedad Civil
Sp.:	Especie
TGI:	Tracto Genital Inferior
TGS:	Tracto Genital Superior
UFC:	Unidades Formadoras de Colonia
UFI:	Unidades Formadoras de Inclusión
<i>Uu:</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPHar:	Virus del papiloma humano de alto riesgo
VPHbr:	Virus del papiloma humano de bajo riesgo
VPH:	Virus del Papiloma Humano
VPH/Uu/Cht:	Virus del Papiloma Humano/ <i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>Chlamydia trachomatis</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

1.1.1 *Epidemiología e Historia Natural. Transmisión de la Infección por VPH*

Actualmente se estima que aproximadamente 14 millones de personas adquieren la infección por el Virus del Papiloma Humano cada año en el mundo. Se considera que una parte significativa de las personas sexualmente activas se infectarán al menos una vez en sus vidas con algún genotipo viral (CDC, 2014). Se ha estimado que la prevalencia mundial de la infección por el virus del papiloma humano se encuentra entre el 11 y 12%, pero existen diversas zonas geográficas donde este índice aumenta considerablemente como en el África Sub-sahariano, el este de Europa y Latinoamérica (Forman et al, 2012).

En los Estados Unidos de Norteamérica, donde se considera que la infección por VPH es la infección de transmisión sexual (ITS) más frecuente, solo el 1% de la población sexualmente activa infectada con el VPH tiene verrugas genitales visibles y aproximadamente el 15% posee una infección subclínica. En ese país las cifras de incidencia más altas (44,8%) se presentan fundamentalmente a mujeres entre los 20 y 24 años (Steben & Duarte-Franco, 2007).

La vía de transmisión de este patógeno más común es la sexual, esto implica tener relaciones sexuales por coito vaginal heterosexual, sin embargo también se ha visto que el virus puede propagarse también por contacto sexual oral o anal (CDC, 2014), incluso últimamente han surgido estudios en donde se relaciona la formación de carcinomas en la orofaringe en jóvenes no fumadores y que no consumen alcohol, (Martin-Hernán *et al.*, 2013). Además, se ha encontrado que también es capaz de transmitirse por vía placentaria y por el canal del parto, causando infecciones fetales o en el recién nacido (Freitas *et al.*, 2013).

En los últimos 30 años se ha observado un incremento significativo en la incidencia y en la prevalencia de la infección por el virus del papiloma humano, tanto en sus formas clínicas o condilomas, como en sus formas de expresión subclínica, identificables por los cambios de citología y/o colposcopia. Mediante técnicas de biología molecular se ha evidenciado, además, la presencia de ADN de VPH en la mayoría de las lesiones

intraepiteliales del tracto genital inferior (TGI) y en más del 99% de los cánceres cervicales (Ellenson & Pirog, 2015).

A nivel epidemiológico se ha visto que cerca del 90% de las infecciones por el Virus del Papiloma Humano son resueltas por el sistema inmune del huésped y desaparecen en un plazo no mayor de 3 años (Moscicki *et al.*, 2012); el otro 10% se convierte en una infección crónica de las que solamente el 1 % progresan a cáncer cervical; el problema con esta infección reside en que suele ser asintomática ya que, a excepción de la presencia de verrugas genitales o papilomatosis interna, no existen síntomas característicos asociados (Mao *et al.*, 2003).

En el lapso de 2 a 10 años, el 60% de las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) se resolverá, el 30% persistirá y el 10% evolucionará hacia lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL). De estas últimas, en ese mismo tiempo el 30% se eliminará, el 60% persistirá y el 10% progresará a carcinoma (Ellenson & Pirog, 2015).

En México, de acuerdo a los registros del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), murieron 4,417 mujeres durante el año 2013 a consecuencia del cáncer cérvico uterino. (Consultado el 2 de junio del 2015 en <http://www.inegi.org.mx>).

Entre los años de 1974 y 1976, Harald zur Hausen (Premio Nóbel de Medicina, 2008) propuso la infección por VPH como factor causal del cáncer cérvico uterino; en años más recientes los estudios epidemiológicos apoyados por las técnicas moleculares han confirmado el papel causal de ciertos tipos de VPH en el desarrollo del cáncer de cérvix uterino y se ha definido como modelo molecular para la carcinogénesis inducida por el VPH (zur Hausen H, 2002; Korzenewski *et al.*, 2011; Venuti *et al.*, 2011; Forman *et al.*, 2012, Handisurya *et al.*, 2012).

Desde la introducción de la citología de Papanicolaou (Pap) en 1928, hace ya casi 90 años, llamada así en honor al médico griego George Papanicolaou (1883-1962), como técnica de rastreo para el cáncer cérvico uterino (Ordoñez-Gallego, 1998), se ha producido una importante disminución en las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer cervical.

La disponibilidad clínica de pruebas sensibles para la identificación y tipificación del VPH ha abierto un debate sobre sus posibles aplicaciones. Actualmente se plantean cuatro indicaciones: 1) Detección primaria, ya sea como técnica única o junto con la citología, para mejorar su sensibilidad; 2) Evaluación de las citologías con Células escamosas atípicas de significado incierto (ASC-US), como test complementario de la citología; 3) Valoración pronóstica de progresión y seguimiento de la LSIL y 4) Control de curación post tratamiento.

Más del 80% las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado de malignidad y el 100% de las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado de malignidad se asocian a los VPH de alto riesgo. El VPH 16 es el subtipo más frecuente en ambas categorías, fue el primero en aislarse de tejido de cáncer cervical y el primero en ser declarado “carcinógeno humano”, necesario para el desarrollo del cáncer cervical (Gillison *et al.*, 2014; Ellenson & Pirog, 2015).

En España se ha calculado que más de 500.000 mujeres requerirían algún tipo de control, considerando que en el rastreo inicial por Pap, 5% de las citologías pueden ser anormales, distribuyéndose ese porcentaje en: 0,5% de HSIL, 1,5% de LSIL y 3% con células escamosas atípicas de significado indeterminado, ASC-US.

En México entre 2005 y 2010, la candidiasis urogenital y la infección por VPH, son las infecciones con una mayor incidencia en jóvenes de 15 a 24 años (12,32/100,000 habitantes), siendo más alta entre los jóvenes de 20 a 24 años (35,44/100,000 habitantes); en un cálculo de proyección hacia el año 2050 no se observa una tendencia clara a la disminución en la edad de infección, lo que es preocupante, pues la infección por VPH es precursora de lesiones que pueden terminar malignizándose (Secretaría de Salubridad y Asistencia. CENEVACE. Anuarios de Morbilidad 1984-2010; CONAPO. Proyecciones de población en México 2005-2050).

De lo anteriormente expuesto se deduce que mientras el carcinoma epidermoide del cérvix uterino se mantenga en el segundo lugar de frecuencia de cáncer en la población femenina a nivel mundial (Schiffman *et al.*, 2001), siguen siendo necesarios estudios que aborden esta temática desde el punto de vista de la patogenicidad y epidemiología.

1.1.2 ***Etiología y Patogenia de la Infección por VPH***

Una de las infecciones de transmisión sexual más comunes y actualmente la más diagnosticada a nivel global es la causada por el Virus del Papiloma Humano, microorganismo que pertenece a la familia *Papoviridae* y corresponde a un grupo muy amplio de virus de ADN de pequeño tamaño, de los que hasta el momento se han identificado aproximadamente 200 genotipos (Haedicke & Iftner, 2013).

El VPH infecta principalmente a los queratinocitos indiferenciados que se encuentran en la capa basal de los epitelios escamosos estratificados de la piel y las mucosas de órganos genitales (cuello uterino, pene, vulva, vagina), ano, orofaringe, amígdalas y células glandulares del endocérvix (Longworth & Laimins, 2004; Handisurya *et al.*, 2012; Dunne *et al.*, 2013). La infección por el Virus del Papiloma Humano ha sido identificada como un carcinógeno humano definitivo, sobre todo en el caso del cáncer de cuello uterino; los datos aportados por algunos investigadores indicaron que la presencia de una concentración alta de VPH representaba un riesgo 12 veces mayor para desarrollar cáncer cervical, comparada con la población general (Serman, 2002) y que la infección por VPH, dentro de los factores de riesgo para cáncer cervical, es uno de los más importantes (Forman *et al.*, 2012).

El desarrollo del cáncer causado por el Virus del Papiloma Humano es debido, en la mayoría de los casos, a una infección persistente por parte del microorganismo, lo que se traduce en una expresión aumentada de los genes virales, que eventualmente llevará a la proliferación celular excesiva. La tasa alta de replicación del ADN y el escaso tiempo disponible para la reparación de éste, ocasionará mutaciones que dañan el genoma de las células infectadas, específicamente en los centros de regulación del ciclo celular, provocando la transformación celular (Doorbar *et al.*, 2012).

En los siguientes esquemas se representan los mecanismos de origen y progresión del cáncer cervical por VPH (Fig. 1).

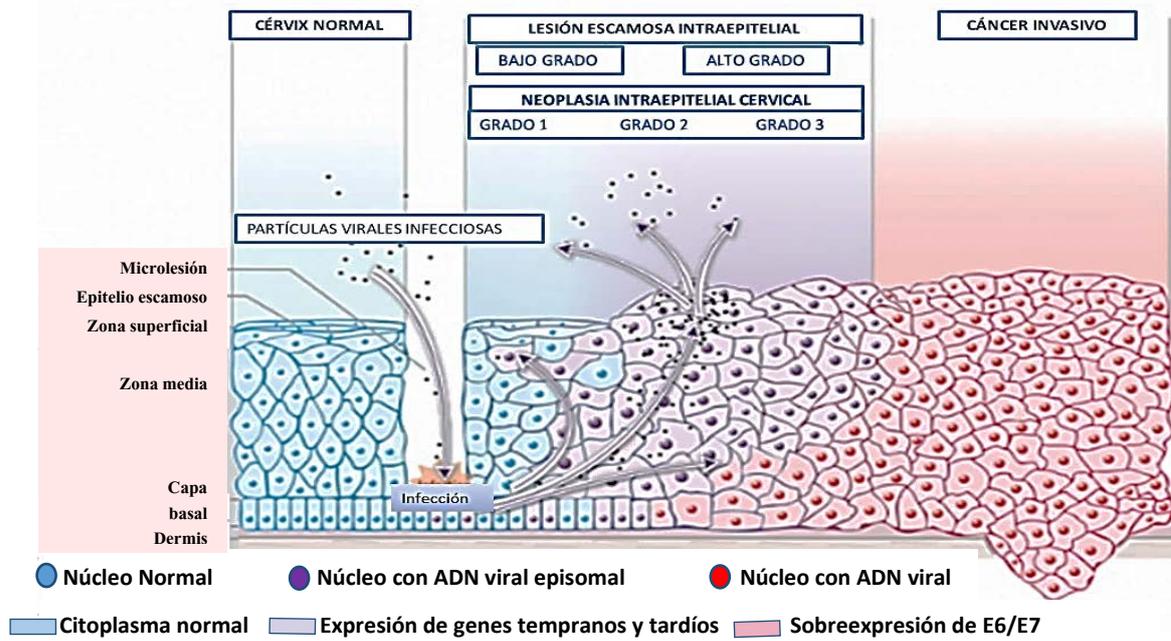


Figura 1A. Inserción del Virus y características de la progresión natural de la infección (Banks *et al.*, 2012).

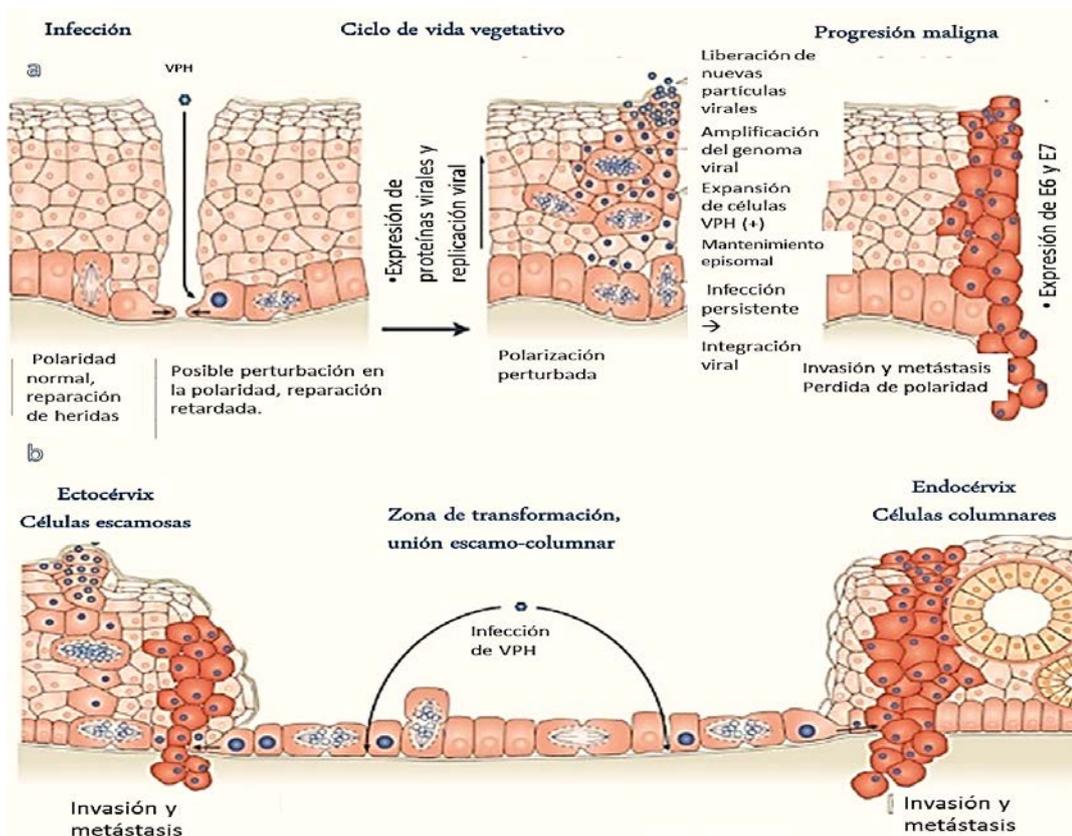


Figura 1B. Progresión natural de la infección por VPH: distintas fases y cambios morfológicos (von Knebel-Doeberitz *et al.*, 1994).

1.1.3 Estructura Básica del Genoma

Los Virus del Papiloma Humano son de ADN circular de doble cadena constituidos por aproximadamente 8000 pares de bases. Se encuentran envueltos por una cápside formada por las proteínas L1 y L2 del virus que se denominan “tardías”; además este virus es capaz de sintetizar seis proteínas llamadas “tempranas” (E1, E2, E4 – E7) que son necesarias para la replicación del ADN viral y el ensamblaje de nuevas partículas virales en las células infectadas (Muñoz *et al.*, 2006). Estas proteínas están controladas por una región reguladora que se encuentra por arriba de las dichas secuencias y que contiene sitios de unión a factores de transcripción que controlan la expresión génica. Se ha visto que las regiones conservadas en todos los VPH son aquellas que codifican las proteínas E1, E2, L1 y L2, las cuales podrían ser las que cumplen tareas básicas de replicación, regulación, estabilización y empaquetamiento de las partículas virales (Bravo & Féllez-Sanchez, 2015).

La proteína L1 es el componente de la cápside más importante, lo que la hace altamente inmunogénica y tiene funciones como la encapsulación del genoma viral, así como la maduración a un estadio más estable para sobrevivir y transfectar otras células y posteriormente desplegarse para liberar el virión en las nuevas células (Buck *et al.*, 2013). La proteína L2 se ensambla en la cápside pero en una proporción de 1:6 con la L1 y tiene una alta importancia en funciones esenciales como la incorporación del ADN viral a la cápside preformada (Woodham *et al.*, 2012).

Las proteínas E6 y E7 del VPH tienen una función muy estrecha entre ellas: alteran el ciclo celular normal de los queratinocitos en las capas basales extendiendo su vida útil y facilitando la inmortalización para lograr una mejor replicación del genoma del virus; la sobreexpresión de estos genes virales se asocia con su integración del ADN viral provocando la alteración en la regulación de la expresión de estas proteínas (Korzeniewski *et al.*, 2011).

Como se mencionó anteriormente, dos proteínas virales indispensables para la replicación son la E1 y la E2, esta última sirve de puente o unión entre el origen de replicación y la proteína E1, cuando esto ocurre, la proteína E2 recluta monómeros de la proteína E1 hacia el origen, donde se formará un complejo de proteína E1 hexamérica doble, que funciona como una helicasa y desacopla el ADN de doble cadena y posteriormente,

junto con otras proteínas celulares como la ADN polimerasa, replicarán el genoma viral (Wallace & Galloway, 2014). No menos importantes son las proteínas E4 y E5 del Virus del Papiloma Humano, la primera contribuye importantemente a la amplificación y la síntesis del genoma viral. Se ha visto que cuando la E4 se sobre expresa, la liberación y transmisión del virus es más eficiente, pudiendo ser un biomarcador de una infección activa del virus de valor pronóstico de severidad de la enfermedad (Doorbar, 2013).

Finalmente la proteína E5 se sintetiza principalmente en células epiteliales suprabasales y al interactuar con diversas proteínas celulares, inducen la transformación celular y la evasión de la respuesta inmune; además junto a la E6 induce la formación de coilocitos, debido a que la proteína E5 relocaliza la calpactina I a la región perinuclear, lo que promueve la fusión de la membrana perinuclear y la formación de la vacuola encontrada en los coilocitos (Venuti *et al.*, 2011).

Los Virus del Papiloma Humano son microorganismos con una maquinaria replicativa de muy alta eficiencia, que poseen diversas propiedades infectivas así como una gama de factores de virulencia muy complejas. Evitan la respuesta inmune aguda y tienden a modificar los mecanismos de regulación celulares, sobre todo aquellos implicados en el ciclo celular (Steben & Duarte-Franco, 2007). De este modo, controlan la viabilidad y diferenciación celulares, logrando una replicación más efectiva que asegura su supervivencia, constituyéndose en agentes carcinogénicos muy importantes.

1.1.4 Clasificación de los VPH. Tipos, Subtipos y Variantes. Relación con la Patología

Los genotipos del Virus del Papiloma Humano son muy numerosos y diversos en cuanto a su tropismo, potencial de malignidad e inclusive formas de replicación; todo esto ha hecho que sea necesaria su categorización en diversas clasificaciones dependiendo de estos factores (Cubie, 2013). El gen de referencia para tipificar las distintas variantes de este virus es la secuencia que codifica para la proteína L1 debido a que es la región más conservada del genoma viral. Se considera que existe un nuevo genotipo cuando la secuencia de ADN en dicho gen difiere en al menos el 10% del genotipo conocido más parecido, cuando esta diferencia es del 2 al 10% se considera un subtipo nuevo, y si es de

menos del 2% se cataloga como una variante del genotipo más parecido (de Villiers *et al.*, 2004).

Una forma de clasificar a los Virus del Papiloma Humano es dependiendo del tropismo tisular que presentan, es decir, de los tejidos que invaden y afectan; así, los Virus del Papiloma Humano *Alpha* infectan principalmente superficies mucosas que, a su vez, pueden ser *Alpha* de bajo riesgo y *Alpha* de alto riesgo dependiendo de su potencial para causar un carcinoma infiltrante (Ghittoni *et al.*, 2015), mientras que los VPH *beta*, *gamma*, *nu* y *mu* son más propensos a invadir epitelios cutáneos y están más ligados al desarrollo de papilomas, verrugas externas y se han asociado al desarrollo de cáncer de piel no melanocítico, aunque su importancia etiológica está aún por comprobarse (Haedicke & Iftner, 2013).

Dentro de los genotipos *Alpha* que afectan principalmente las mucosas, existe una subdivisión, debido a que ciertos Virus del Papiloma Humano son más propensos a causar verrugas genitales benignas, los cuales son denominados *Alpha* VPH de bajo riesgo y corresponden a los genotipos 6, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, y el CP6108. Por otro lado, se encuentran los *Alpha* VPH de alto riesgo y estos representan el grupo asociado a la mayoría de los carcinomas cervicales, pero también a algunos otros como el laríngeo, o el esofágico y corresponden a las variantes: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 (Ghittoni *et al.*, 2015). Universalmente se acepta en la actualidad, que casi todos los cánceres invasivos y las neoplasias intraepiteliales de alto grado se correlacionan con algún tipo de VPH de alto riesgo; los VPH 16 y 18 existen subyacentemente como agentes causales del 50% de las lesiones pre malignas y en más del 70% del cáncer cervical en todo el mundo. El VPH 16 es el más frecuente en el carcinoma de células escamosas, mientras que el VPH 18 es más común en el adenocarcinoma.

De acuerdo a datos obtenidos en estudios retrospectivos de varios países, los genotipos más asociados al desarrollo de cáncer cervical son los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58, presentes en el 81% de los carcinomas cervicales (de Sanjose *et al.*, 2007; de Sanjose *et al.*, 2010); en México recientemente se han encontrado que los genotipos 16, 58 y 52 (*Alpha* VPH de alto riesgo) son los más frecuentes en la población (Magaña-Contreras *et al.*, 2015).

1.1.5 Biología del VPH. Progresión Natural de la Enfermedad, Infección Latente e Infección Productiva

Los Virus del Papiloma Humano tienen diversas características biológicas que los hacen ser agentes altamente infecciosos en condiciones favorables, y son capaces de vivir en las células durante tiempos prolongados llevando un ciclo de vida vegetativo, es decir, replicándose lentamente, o también llegar a sobre expresar sus proteínas virales hasta integrarse en el ADN de la célula huésped causando mutaciones que conducirán al desarrollo de cáncer (Alfaro Castro & Fournier Pérez, 2013).

La infección por el Virus del Papiloma Humano comienza por la penetración del virus en una de las células proliferantes indiferenciadas de la capa basal del epitelio que haya sufrido alguna microlesión, una vez dentro el virus se despliega y forma un episoma (cadena de ADN libre, fuera del núcleo en una célula eucariota) que se mantiene en un bajo número de copias en el núcleo y solamente se expresan las proteínas tempranas del virus (Tornesello *et al.*, 2013).

Una vez que la infección se establece, el genoma viral debe dividirse para seguir replicándose en los queratinocitos, para dicho efecto existen diversos mecanismos como el puente creado por la proteína E2 que acarrea el genoma viral y mantiene el ADN viral dentro del núcleo en forma de episomas, para después ser distribuido equitativamente durante el proceso de mitosis, de otra manera, si el virus no entra en el núcleo, las copias extra cromosomales del VPH se perderán durante la citocinesis (Bodily & Laimins, 2011). Generalmente, durante la fase latente de la infección, también llamada fase de mantenimiento viral, se sintetizan por lo menos las proteínas E1 y E2 de Virus, las cuales se unen a proteínas del huésped desplegadas por la respuesta al daño en el ADN lo que las hace más estables para su replicación (Wallace & Galloway, 2014).

Llega un punto en el transcurso de la infección en donde el mantenimiento de la replicación cambia y se convierte en un ciclo productivo o infección productiva. Se han descrito muchos mecanismos para la instauración de este cambio, pero el más aceptado es la activación de la expresión del promotor tardío viral, que resulta en una expresión alta de proteínas de replicación viral E1 y E2 en conjunto con los genes tardíos, debido a que este

promotor no está regulado por la proteína E2. De esta manera se consiguen altos niveles de expresión y amplificación del ADN, aún en células diferenciadas (Longworth & Laimins, 2004).

Eventualmente la infección entrará en una fase replicativa y se activará una producción activa de viriones encapsulados, en especial la expresión de las proteínas E6 y E7 en las capas granular y espinosa del epitelio; en ellas se inicia la diferenciación y se origina el cambio morfológico de las células epiteliales que forman coilocitos, células patognomónicas de la infección (Pyeon et al, 2009). La diferencia más importante entre los genotipos de bajo riesgo y de alto riesgo es que estos últimos se integran en el genoma en el ADN del huésped, mientras que los de bajo riesgo solo se mantiene como episomas. La integración al ADN del huésped conduce a cambios en la respuesta de la célula hacia dicho año y en el ciclo celular con la ulterior transformación hacia malignidad (Longworth & Laimins, 2004).

1.1.6 Interacción Virus Huésped. Inmunidad de la Infección VPH

Los mecanismos propuestos de infección y de unión a las células epiteliales basales por parte del virus son muy diversos e involucran principalmente el contacto con la membrana basal, específicamente con los proteoglicanos de heparán sulfato, que son los receptores más evidentes del VPH al unirse con la proteína L1 in vivo (Sapp & Bienkowska Haba, 2009).

En los últimos años se ha descrito que en la zona de transformación (unión escamocolumnar), sitio donde se generan la mayoría de las lesiones intraepiteliales que conducen a la carcinogénesis, existe una reducción significativa de las células de Langerhans comparadas contra el exocérvix (Giannini *et al.*, 2002) y que además la expresión de interleucina – 10 inmunosupresora es mayor que en el exocérvix (Mota *et al.*, 1999).

Una de las características distintivas de la infección por el Virus del Papiloma Humano es la poca eficiencia del sistema inmune para detectar los viriones, tanto por las células de la inmunidad innata como de la respuesta adaptativa. Se ha visto cierta asociación entre la deficiencia de células inmunitarias con el aumento en la persistencia viral por ejemplo en el individuo que presenta inmunosupresores, o en aquellos infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida (Okechikwu, 2011).

Por otra parte, el Virus del Papiloma Humano por sí solo es capaz de generar un efecto anti-inflamatorio local, en el que las células del sistema inmune son ineficientes para responder ante este patógeno. La mayoría de los mecanismos que utiliza el VPH para suprimir la respuesta inmune se basan en la reducción de la expresión de los genes que codifican proteínas necesarias para dicha respuesta mediante la expresión preferencial por parte de la célula de las proteínas E6 y E7 del VPH (Amador-Molina *et al.*, 2013).

1.1.7 Mecanismos de Oncogénesis. Regulación del Ciclo Celular

Los genotipos del Virus del Papiloma Humano de alto riesgo se han catalogado como agentes carcinogénicos debido a diversas propiedades que poseen; la diferencia principal estriba en la cantidad o la abundancia relativa de las proteínas E6 y E7 que despliegan los virus de alto riesgo que es mucho mayor que la de los de bajo riesgo (Longworth & Laimins, 2004). En este sentido, generalmente la sobreexpresión de estas proteínas en la célula huésped es un signo de transformación celular hacia la malignidad, por lo que la determinación de estas proteínas se ha considerado como un patrón de referencia para evaluar el estado de la infección (Origoni *et al.*, 2015).

La capacidad que tiene el Virus del Papiloma Humano para evadir al sistema inmunológico es vital para que se instale una infección persistente, este hecho eventualmente provocará que el ADN del Virus se integre al genoma de la célula huésped, lo cual es un paso esencial para el efecto carcinogénico (Woods *et al.*, 2014).

Según numerosos estudios realizados sobre la patogénesis del VPH, las proteínas que produce y la manera en la que éstas interactúan con las células huésped, se ha descrito que las proteínas pRB y p53 son las más propensas a sufrir mutaciones en sus secuencias, perdiendo su función característica de regular el ciclo celular (Muñoz *et al.*, 2006). La proteína E6 interacciona con la proteína p53, dando como resultado la proteólisis ubiquitina dependiente de esta última lo que impide que la célula entre en apoptosis; por su parte la proteína E7 se une a la proteína pRb interfiriendo sobre el control del ciclo celular, siendo así las proteínas virales E6 y E7 moléculas que alteran la mitosis y llevan a la célula a un estado de immortalización (Snijders *et al.*, 2006).

Como consecuencia de la alteración en la regulación de los ciclos celulares se produce una alta tasa de mitosis celular. En distintos estudios se ha observado que dichas moléculas inducen anomalías en los centrosomas de los cromosomas, provocando así alteraciones en la disrupción y aumentando el riesgo de una segregación errónea de éstos, además de que se producen daños en el ADN, como rupturas e inestabilidad cromosómica, a una velocidad que hace imposible su reparación por los mecanismos celulares habituales (Korzeniewski *et al.*, 2011). Todo esto provoca en algún punto mutaciones irreparables en las secuencias génicas del ADN del huésped, que eventualmente llevarán a la célula hacia la malignización.

También existen ciertos factores de riesgo que se han asociado con la aparición de un carcinoma cervical cuando existe una infección por el Virus del Papiloma Humano de alto riesgo como la multiparidad, el tabaquismo, el uso indiscriminado de anticonceptivos orales y la coinfección con otros patógenos de transmisión sexual, entre ellos la bacteria *Chlamydia trachomatis* (Muñoz *et al.*, 2006).

Los siguientes esquemas ilustran la influencia de cofactores en la producción de cáncer por el Virus del Papiloma Humano (Figs. 2-4).

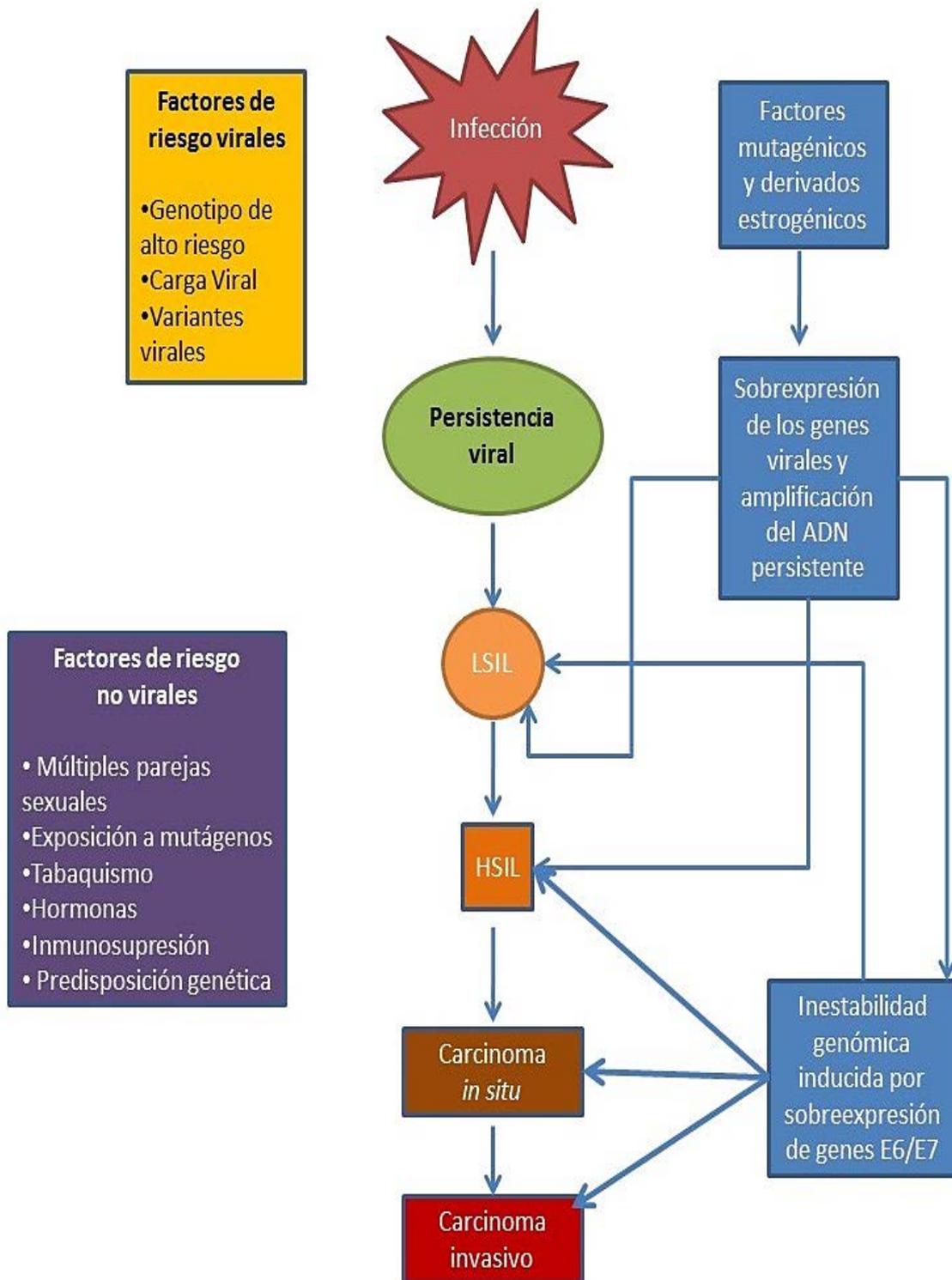


Figura 2. Interacción de la infección por VPH con la respuesta del huésped (zur Hausen, 2002). La mayoría de los mecanismos con los que el VPH suprime la respuesta inmune se basan en la reducción de la expresión de los genes que codifican proteínas para dicha respuesta mediante la expresión preferencial por parte de la célula de las proteínas E6 y E7 del VPH.

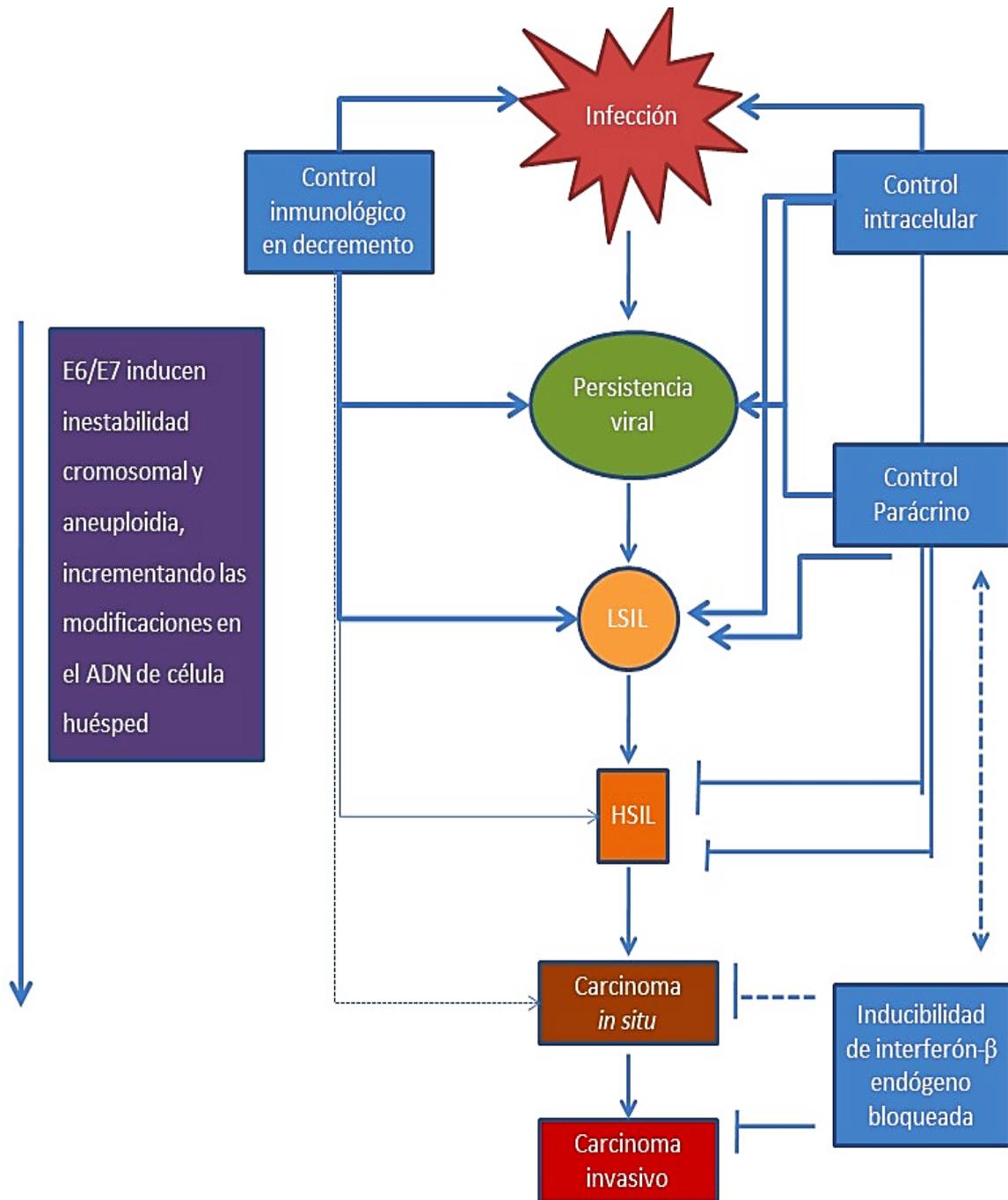


Figura 3. Interacción de la infección por VPH con la respuesta del huésped (zur Hausen, 2002). La expresión de las proteínas E6 y E7 en las capas granular y espinosa del epitelio; en ellas se inicia la diferenciación y se origina el cambio morfológico de las células epiteliales que forman coilocitos, células patognómicas de la infección.

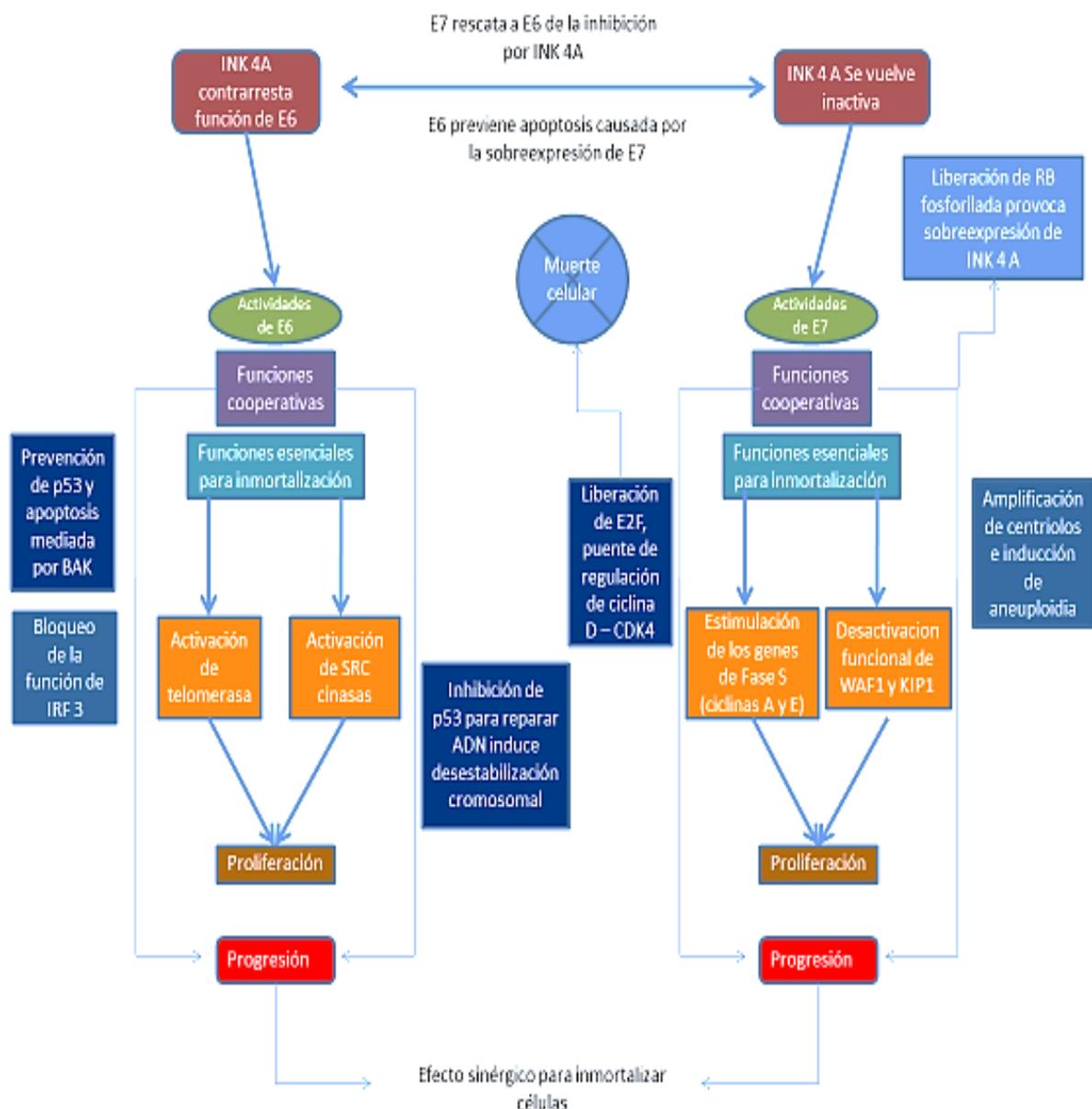


Figura 4. Actividades oncogénicas y funciones cooperativas entre las proteínas E6/E7 del VPH (zur Hausen, 2002). Efecto sinérgico para inmortalizar a las células.

1.2 VPH Y CÁNCER: PATOLOGÍA CLÍNICA

1.2.1 Formas de Expresión de la Infección por el Virus del Papiloma Humano

Los Virus del Papiloma Humano presentan una gama diversa de manifestaciones clínicas que pueden atribuirse a su patogenicidad; de ahí que sea importante conocer que no todos los genotipos virales causan los mismos signos y síntomas, muchos difieren en la forma clínica de la infección, algunos causan lesiones benignas en la piel y membranas de las

cavidades mucosas, otros en cambio, forman tumores en zonas mucocutáneas, están implicados en enfermedad de Bowen, carcinomas no melanocíticos y, por último, carcinomas genitales (Leto *et al.*, 2011; Dunne & Park, 2013).

Entre las lesiones cutáneas más frecuentes se encuentran las verrugas comunes (*Verrucae vulgaris*) que se suele encontrar en manos y dedos ya que es donde frecuentemente ocurren microlesiones por donde puede penetrar el virus, otras son las verrugas plantares o las planas. Otra forma importante de manifestación es el condiloma, localizado en la zona anogenital, y la epidermodisplasia verruciforme (Cardoso & Calonje, 2011).

1.2.2 Lesiones Clínicas y Lesiones Subclínicas

Así como las manifestaciones clínicas, también las lesiones tienen diferentes maneras de presentarse dependiendo de la zona epitelial afectada y el genotipo que infecte dicha zona. Los signos y síntomas más asociados a la infección por el Virus del Papiloma Humano genital son la erosión vaginal, la cervicitis crónica, las laceraciones en la pared vaginal o de la superficie cervical, la hipertrofia cervical, el sangrado intermenstrual y coital, el crecimiento de úlceras o pólipos cervicales y las descargas anormales provenientes del cérvix (Verma *et al.*, 2014) aunque todas estas manifestaciones no son específicas de la infección por el VPH.

Las lesiones típicas de una infección por VPH son los condilomas acuminados, sobre todo en aquellas infecciones que han pasado al estado de persistencia, ya que comúnmente cuando estas lesiones aparecen, el sistema inmunológico competente, de una persona sería capaz de eliminarla y erradicar la infección en un plazo de aproximadamente de seis a nueve meses (Gall, 2002).

Los condilomas acuminados son excrecencias pedunculadas o de base amplia, de color rosa cuando crecen rápido, grises, blandas y carnosas que aparecen solas o en grupos. El tamaño de una lesión es variable, desde unos cuantos milímetros de espesor hasta varios centímetros, con algunas lesiones circundantes dando la apariencia de una coliflor (Dunne & Park, 2013).

Son comunes las lesiones cervicales, que pueden identificarse fácilmente y tienen una morfología plana y endofítica, pero las lesiones acuminadas también son comunes, con una apariencia blanca y consistencia blanda. Todas las lesiones descritas hasta aquí son de bajo grado de malignidad según el sistema Bethesda. Una manera de identificar las lesiones de alto grado de malignidad es su tendencia a limitarse a la zona de transformación, cosa que no sucede con las lesiones de bajo grado (Gall, 2002).

La principal lesión subclínica que se presenta en la infección causada por el Virus del Papiloma Humano es la aparición de células anormales denominadas coilocitos y que son consecuencia del metabolismo propio del virus en el queratinocito. Estas células presentan diversas características muy distinguibles como lo son un núcleo excéntrico, hipercromático y aumentado de tamaño que se encuentra rodeado por una gran vacuola perinuclear formada por la destrucción de los filamentos de citoqueratina, a su vez causada por la proteína E5 del VPH. La presencia de estas células en una citología cervical es signo patognomónico de la infección por el Virus del Papiloma Humano (Krawczyk *et al.*, 2008).

1.2.3 Diagnóstico: Citología, Colposcopia, Pruebas Moleculares y sus Aplicaciones Clínicas

Hasta la fecha, la citología cervical tradicional con tinción de Papanicolaou ha sido considerada como el método de estudio más eficiente en cuestión de tiempo y costo para el monitoreo de la aparición de cáncer cérvico-uterino, pero presenta deficiencias de sensibilidad (30-60%) que podrían arrojar resultados falsos negativos. Se ha argumentado que detalles como la aleatoriedad de la distribución de las células neoplásicas, errores en la toma, preparación y tinción de las muestras, podrían enmascarar zonas clave para el diagnóstico (Cuschieri & Cubie, 2005). No obstante, existe una mejor opción para la revisión cervical que posee mayor sensibilidad que la citología cervical convencional: la llamada citología en base líquida o LBC por sus siglas en inglés (liquid-base cytology). Esta forma de procesar la citología es capaz de reducir los resultados falsos negativos que arrojan las citologías cervicales; sin embargo existe una cierta controversia acerca de su costo-efectividad, debido a que si bien es considerada más sensible que la citología tradicional, no tiene una sensibilidad superior al 80% (McGoogan, 2004).

Uno de los procedimientos más importantes para la determinación de la presencia de tejido canceroso es la colposcopia, que permite reconocer visualmente las lesiones que el Virus del Papiloma Humano provoca en el cuello uterino mediante la utilización de ácido acético: si las lesiones se colorean de blanco al estar en contacto con el ácido acético se consideran como lesiones cancerosas o precancerosas (Massad *et al.*, 2013). Se considera que la colposcopia debe ser indicada cuando una mujer tiene dos resultados del test de VPH positivos y no se encuentran anormalidades en la citología; la técnica colposcópica incluye la toma una biopsia dirigida al tejido lesionado para caracterizarlo histopatológicamente (Schiffman & Wentzensen, 2015).

El procedimiento considerado como “estándar de oro” para la detección del Virus del Papiloma Humano es la amplificación de ácidos nucleicos. Actualmente, existen kits comerciales aprobados disponibles para su venta y son recomendados por el CDC en el año 2007 (CDC, 2007), debido a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez, comparada contra las técnicas de cultivo celular (Gaydos & Hardick, 2014).

Sin embargo la implementación de estas técnicas y la infraestructura necesaria tiene un elevado coste, por lo que la mayoría de la población no puede acceder a estas pruebas, sobre todo el sector de bajos recursos, el cual es el más afectado por estas infecciones. Esta situación ocasiona que la infección por VPH siga sin ser detectada a tiempo y evita que se realicen tratamientos oportunos que logren erradicarlas (Owusu-Edusei *et al.*, 2013).

1.3 INFERTILIDAD POR FACTOR INFECCIOSO

1.3.1 *Definición y Frecuencia*

En la actualidad los problemas reproductivos afectan a una gran cantidad de parejas. La infertilidad humana está definida como la incapacidad de una pareja para concebir y tener descendencia después de al menos doce meses consecutivos de relaciones sexuales sin protección, ya sea que haya habido o no previamente una gestación con un nacido a término vivo.

La infertilidad es una compleja situación de la salud humana que, además de la función orgánica, altera la calidad de vida de las parejas que se enfrentan a esta situación. En el año

2010 alrededor del 1,9% y 10,5% de las mujeres en edad reproductiva (20 a 44 años) se vieron afectadas por un problema de infertilidad primaria y/o secundaria respectivamente. Está documentado que una alta prevalencia de problemas de fertilidad se observa en el Sur de Asia, África, Oriente Medio, Europa Central, Europa Oriental y Asia Central (Mascarenhas *et al.*, 2012).

1.3.2 Infecciones Genitourinarias y Gérmenes Asociados a la Infertilidad

Las infecciones inespecíficas del aparato genitourinario se asocian a otros trastornos de la reproducción que afectan a un número cada vez mayor de parejas desde hace algunas décadas. La infertilidad sin explicación, el aborto recurrente, el sangrado uterino disfuncional, el dolor pélvico, el síndrome premenstrual, el parto prematuro, la insuficiencia placentaria y la preeclampsia, son ejemplos comunes de problemas obstétricos y ginecólogos que por años carecieron de una explicación adecuada (Viniker, 1999; Bachir & Jarvi, 2014).

En las últimas décadas, un gran número de trabajos publicados asocian las infecciones genitales con el fracaso en técnicas de reproducción asistida (Licciardi *et al.*, 1992; Spandorfer *et al.*, 2006; Van Hamont *et al.*, 2006; Perino *et al.*, 2011), siendo cada vez más amplio el consenso acerca de su diagnóstico y tratamiento específico previo como medida que mejora las tasas de éxito en la fecundación *in vitro* y la implantación embrionaria (Sharara & Queenan, 1999; Wang *et al.*, 2008). Sin embargo, aun reconociendo que la vaginosis y el antecedente de infección clamidial estaban asociadas a infertilidad, en algunas investigaciones se negaba que éstas afectaran las tasas de éxito en reproducción asistida (Gaudoin *et al.*, 1999).

Hace años que se considera que el inicio temprano de la actividad sexual y el tener varias parejas sexuales incrementan el riesgo de contraer infecciones. En este sentido, las infecciones inespecíficas, por permanecer largo tiempo sin ser diagnosticadas, llegan a comprometer la futura capacidad reproductiva (Nuñez-Troconis, 1999).

En la mujer, gérmenes que antiguamente eran considerados como causa poco probable de IGU tales como *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *M. hominis* y *U. urealyticum*, han

sido aislados a partir de secreciones cérvico-vaginales, de material endometrial, de muestras de fluidos y tejidos obtenidos por histeroscopia y laparoscopia. Estos gérmenes se han asociado a obstrucción tubárica, hidrosálpinx y síndrome adherencial (Taylor-Robinson, 1974; Brunham *et al.*, 1985; Diquelou *et al.*, 1989; Rosas Arceo *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 2002; Anagrius *et al.*, 2005; Ross & Jensen, 2006; Baczynska *et al.*, 2007; Manhart *et al.*, 2007; Taylor-Robinson *et al.*, 2009).

Uno de los géneros bacterianos más importante perteneciente a esta familia es *Ureaplasma urealyticum*, comúnmente considerada como bacteria residente de la flora microbiana en el tracto genitourinario; sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales, ha sido relacionada con patologías de esta región anatómica (Volgman *et al.*, 2005; Lukic *et al.*, 2006). En los adultos, esta bacteria se ha encontrado asociada con uretritis no gonocócica, epididimitis, urolitiasis y con problemas reproductivos e infertilidad (Yoon *et al.*, 1998; Gonzáles *et al.*, 2004; Denks *et al.*, 2007).

Ureaplasma urealyticum y *Chlamydia trachomatis* son bacterias caracterizadas por invadir el epitelio columnar de revestimiento del cérvix. En esta localización, el proceso infeccioso genera una intensa respuesta inflamatoria, caracterizada por la presencia de enrojecimiento de la región circundante, además de importantes descargas exudativas y estos factores determinan la aparición de síntomas clínicamente evidentes (Smith *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 2009).

1.3.3 *Mycoplasma sp* y *Ureaplasma Urealyticum*

Las infecciones por bacterias de la familia Mycoplasmataceae están ampliamente asociadas a trastornos reproductivos, andrológicos y ginecoobstétricos (Smith *et al.*, 1995; Volgman *et al.*, 2005; Gallegos *et al.*, 2008; Gallegos-Ávila *et al.*, 2009a,b; Gallegos-Ávila *et al.*, 2013).

El papel fundamental de las infecciones genitales por *Mycoplasma sp.* sobre la salud reproductiva ha sido de interés desde hace algún tiempo. Así, se han descrito nuevas evidencias de su participación directa en la corioamnionitis y su asociación con abortos sépticos, con el bajo peso de los niños al nacimiento, con infecciones perinatales, fiebre

puerperal y últimamente a partos prematuros e infertilidad de etiología no conocida (Cassell *et al.*, 1993; Nuñez-Troconis, 1999; Lukic *et al.*, 2006; Denks *et al.*, 2007; Gdoura *et al.*, 2008).

La importancia etiológica de *U. urealyticum* en la infertilidad fue sugerida también por Gnarpe y Friberg, quienes en 1972 observaron una frecuencia alta de cultivos positivos en el semen de pacientes infértiles (85%), si se compara con un 22% de hombres fértiles. Estos mismos autores en 1973, investigando aspectos de infertilidad, demostraron mediante microscopía electrónica de barrido, que los micoplasmas se adherían al espermatozoide (Gnarpe & Friberg, 1973). Estas observaciones sobre la asociación física del Mycoplasma con los espermatozoides fueron luego confirmadas por otros autores (Fowlkes *et al.*, 1975; Busolo *et al.*, 1984; Grossgebauer & Hennig, 1984; Xu *et al.*, 1997; Núñez-Calonge *et al.*, 1998). En trabajos realizados por nuestro grupo, hemos evidenciado la presencia de agregados de partículas correspondientes a *U. Urealyticum* adheridas a los espermatozoides y en el interior de su citoplasma (Díaz-Gutiérrez y Gallegos de Lerma, 1996; Gallegos-Ávila, 2003; Gallegos *et al.*, 2008; Gallegos-Ávila *et al.*, 2013).

Con la aplicación de técnicas de PCR para la correcta identificación de *U. urealyticum*, han surgido nuevas hipótesis para esclarecer el papel etiológico de las infecciones causadas por este germen y su relación con la infertilidad de la pareja. De hecho, éstas técnicas moleculares están facilitando el diagnóstico de un mayor número de pacientes infectados, si se compara con la incidencia de diagnósticos realizados mediante cultivos específicos (Blanchard *et al.*, 1993; Teng *et al.*, 1994; Gdoura *et al.*, 2008).

1.3.4 *Chlamydia Trachomatis*, Prevalencia y Patologías Inflamatorias Asociadas

La prevalencia de la infección causada por *C. trachomatis* es muy importante ya que está considerada la infección bacteriana de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial; se sabe que la prevalencia de este germen se ha incrementado notablemente en las últimas décadas y que eso se relaciona con los cambios en el estilo de vida (Oriel *et al.*, 1972; Woolfitt & Watt, 1977; Schachter, 1985; Witkin & Linares, 2002; Low, 2004; Kucinskiene *et al.*, 2006; CDC, 2007).

Las últimas estimaciones de la OMS indican que las infecciones por esta bacteria tienen una incidencia anual de 92 millones de casos en todo el mundo, cifra que, sin embargo, se considera todavía por debajo de la cifra real de afectados (World Health Organization, 2012).

Muchos autores e instituciones como el Centro de Prevención y Control de Enfermedades Infecciosas, *US Preventive Services Task Force* y *European Center for Disease Prevention and Control*, recomiendan hacer el cribado rutinario de la infección tanto en mujeres como en hombres para *C. trachomatis* (CDC, 2007). Los programas de detección rutinaria de *C. trachomatis* en los países desarrollados han reducido la transmisión y las complicaciones asociadas a la infección por esta bacteria (Kucinskiene *et al.*, 2006; Filipp *et al.*, 2008; Wallace *et al.*, 2008; Bébéar *et al.*, 2009; Joesoef *et al.*, 2009).

A pesar de que las infecciones genitales por *Chlamydia trachomatis* no complicadas, son a menudo silentes en el hombre y que en el 80% de mujeres siguen un curso poco sintomático, desde hace más de dos décadas se asocian con una morbilidad reproductiva grave. Esto se debe a que las complicaciones y secuelas de la infección genitourinaria por *Chlamydia trachomatis* constituyen la causa más común de la infertilidad adquirida en humanos, de complicaciones obstétricas, incluidas el aborto repetitivo y de secuelas prolongadas en los hijos recién nacidos (Taylor-Robinson & Thomas, 1980; Weström, 1990; Zimmerman *et al.*, 1990; Mardh, 2002; Gdoura *et al.*, 2008).

En las personas sexualmente activas, menores de 25 años de edad, se ha descrito que la prevalencia de infección genital por *Chlamydia trachomatis* es mayor del 20%, ocasionando uretritis y epididimitis en hombres; a la par de las infecciones genitourinarias masculinas, aparece la infección genital en la mujer ocasionada por *Chlamydia trachomatis*, como la enfermedad de transmisión sexual más frecuentemente observada en las jóvenes, que en consecuencia desarrollan cervicitis, endometritis, y salpingitis (Paavonen & Eggert-Kruse, 1999; Stamm & Norrby, 2001; Terán *et al.*, 2001; Marrazzo, 2007; Cunningham & Beagley, 2008).

Las alteraciones en el epitelio tubárico parecen ser la causa principal por la que estas bacterias disminuyen el potencial fértil en la mujer. De hecho, la infección por *Chlamydia*

trachomatis es considerada la causa más importante en la génesis de laceraciones y obstrucción tubárica, enfermedad pélvica inflamatoria y síndrome adherencial (Stamm & Norrby, 2001; Marrazzo, 2007; Pellati *et al.*, 2008).

Chlamydia trachomatis infecta las células epiteliales columnares del cérvix y endocérvix ocasionando, en la gran mayoría de los casos, inflamación crónica y asintomática de esta región del tracto reproductivo. Existe evidencia de que las mujeres con una infección por *Chlamydia trachomatis* previa son 4 veces más propensas a desarrollar obstrucción en las trompas de Falopio que las mujeres que no han tenido la infección. Además del daño en la mucosa y el músculo liso tubáricos, la infección por *Chlamydia trachomatis* causa adhesión y obstrucción de la trompa y, como resultado, afecta la función de las fimbrias, lo que lleva a la infertilidad (Nalbanski *et al.*, 1999; Hebb *et al.*, 2004; Equils *et al.*, 2006).

C. trachomatis es un patógeno frecuente de relación causal con la enfermedad pélvica inflamatoria (EPI); se ha aislado del tracto genital superior en una cuarta parte de los pacientes con EPI (Ness *et al.*, 2005). Esta bacteria se asocia tanto con endometritis (Haggerty *et al.*, 2010), como con salpingitis confirmada por laparoscopia (Hebb *et al.*, 2004; Eckert & Lentz, 2007). Sin embargo, las tasas de progresión varían ampliamente entre los pacientes.

A pesar de los avances que se han logrado en el conocimiento de la biología, la patogénesis, la genómica y la epidemiología de la bacteria, hoy en día, las infecciones por *C. trachomatis* causan pérdidas económicas originadas por su alta morbilidad y el gran impacto socioeconómico en todo el mundo. El tropismo estricto que presenta la bacteria hacia las células epiteliales mucosas, el complejo sistema biológico y la estructura antigénica, además de su importante predilección para provocar infecciones persistentes, han ocasionado que esta bacteria se presente como un reto a vencer para el desarrollo de una vacuna que prevenga los daños de la infección.

Dentro de los factores de riesgo se menciona que las personas al parecer más vulnerables son las mujeres jóvenes: *C. trachomatis* afecta principalmente a personas con edades comprendidas entre 15 y 24 años (Low, 2004); probablemente por la característica

anatómica de tener la unión escamoso-columnar del cérvix expuesta, lo que favorece la infección (Black, 1997; de Luca *et al.*, 2006).

1.3.5 **Importancia de la *Chlamydia Trachomatis* en el Cáncer Cervical**

Chlamydia trachomatis también se ha referido como una causa asociada a la alteración del ciclo de las células huésped; en este sentido hay evidencias de que algunas especies de *Chlamydia* se asocian a la transformación neoplásica.

Estudios recientes relacionan a *Chlamydia trachomatis* con el cáncer de ovario dada la homología existente entre la molécula Hsp60 expresada por esta bacteria y la expresada por las células epiteliales. También se ha formulado la hipótesis de que este tumor puede ser ocasionado por la infección inicial de la fimbria tubárica (Ness *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha abordado la posible asociación de *C. trachomatis* con el linfoma asociado a mucosas (MALT) en pulmón y con el cáncer prostático (Littman *et al.*, 2004; Anttila *et al.*, 2005).

El paradigma celular en la patogénesis de la infección por *Chlamydia trachomatis* establece que la respuesta del huésped a la infección se inicia y es sostenida por las células epiteliales que son las primeras dianas de la infección por esta bacteria. Las células epiteliales infectadas actúan como primera línea de defensa, iniciando y propagando la respuesta inmune en contra de la infección, llevan a cabo la secreción de quimiocinas que inducen el reclutamiento de leucocitos hacia el sitio de la infección. Por otro lado, liberan citocinas que inician y potencian la respuesta inflamatoria y son estos mediadores de la respuesta inflamatoria quienes ocasionan el daño directamente en el tejido del huésped (Rasmussen *et al.*, 1997; Stephens, 2003).

Adicionalmente, *C. trachomatis* es considerada como un facilitador del ingreso del virus de inmunodeficiencia humana y del virus del papiloma humano al epitelio cervical y ha sido implicada como posible cofactor en la etiología del cáncer cervical (Taylor-Robinson & Thomas, 1980; Cates, 1991; Kihlström & Danielsson, 1994; Fleming & Wasserheit, 1999; Smith *et al.*, 2002; Luostarinen *et al.*, 2004; de Luca *et al.*, 2006; De Lucena-Oliveira *et al.*, 2008; European Centre for Disease Prevention and Control, 2008) debido a que los virus se adquieren más fácilmente en presencia de células inflamatorias en el tracto genital (De

Lucena-Oliveira *et al.*, 2008; Fleming & Wasserheit, 1999). La frecuencia de la infección por *C. trachomatis* es significativamente mayor en pacientes con lesiones cervicales intraepiteliales que sin lesiones: 80 % vs 14,3% (De Lucena Oliveira *et al.*, 2008).

Por otra parte, Paba y colaboradores realizaron en el 2008 un estudio de 149 pacientes con cáncer cervical o neoplasia intraepitelial y demostraron que la infección con *C. trachomatis* favorece la entrada y persistencia de múltiples tipos de HPV trayendo como consecuencia la integración viral, la inhibición de la apoptosis, la sobreexpresión de los oncogenes E6/E7 y la transformación celular (Paba *et al.*, 2008).

1.3.6 Asociación de la Infertilidad con la Infección por VPH

Como puede comprobarse en la literatura mundial, la relación entre la infección por VPH y la inducción del cáncer está bien documentada, sin embargo no se aclara aún si las infecciones por VPH pueden afectar la salud reproductiva.

Lai *et al.*, en un estudio transversal en el que incluyeron 24 hombres con infección por VPH, encontraron una disminución estadísticamente significativa del número de espermatozoides, observación que fue confirmada diez años después, por Bezold *et al.*, en un estudio de casos y controles (Lai *et al.*, 1997; Bezold *et al.*, 2007). Posteriormente varios estudios epidemiológicos indicaron que en presencia de infección por VPH existe una tendencia a la reducción de la concentración y motilidad de los espermatozoides en el líquido seminal pero sin que esta asociación alcanzara un grado estadísticamente significativo (Foresta *et al.*, 2010; Garolla *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

Una observación importante acerca de la interacción del VPH con los espermatozoides fue hecha por Perez-Andino *et al.*, al describir la adhesión del VPH 16 a la zona ecuatorial del segmento cefálico de esa célula. No obstante, con respecto a afectación de la morfología espermática por el VPH, tampoco existe un consenso en las publicaciones de los últimos años (Perez-Andino *et al.*, 2009; Foresta *et al.*, 2010; Garolla *et al.*, 2013; Schillaci *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Revisiones bibliográficas recientes (Foresta *et al.*, 2015; Souho *et al.*, 2015), siguen intentando aclarar la importancia de la infección del espermatozoide por VPH y posibles tratamientos.

Aunque no hay referencias sobre la posible acción del VPH en la función ovárica y hormonal en mujeres con incapacidad de procrear, distintos estudios han demostrado una asociación significativa entre la infección por VPH y el fallo de los procedimientos de fertilización *in vitro* (Spandorfer *et al.*, 2006; Van Hamont *et al.*, 2006; Perino *et al.*, 2011;). Otros autores han relacionado la pérdida embrionaria y fetal con ruptura prematura de membranas en mujeres con citologías cervicales anormales e infección por VPH (McLaren *et al.*, 1999; Goldenberg *et al.*, 2000; Hernández-Girón *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2013).

Desde hace más de dos décadas diferentes estudios han investigado la importancia de la infección por VPH en la pérdida embrionaria espontánea, sin encontrar una asociación clara entre los dos eventos (Hermonat *et al.*, 1997). En Polonia, Skoczynski *et al.*, detectaron ADN de VPH en el 17,7% de productos de aborto y en el 24,4% de las placentas de productos nacidos a término (Skoczynski *et al.*, 2011). En el año 2013, un grupo de investigadores (Conde-Ferrález *et al.*, 2013) publicó los resultados de un estudio de casos y controles de pacientes con aborto espontáneo del sureste de México, encontrando una prevalencia de infección cervical por VPH de 19,8% en la población estudiada, 24,4% en pacientes con aborto y 15,2% en mujeres con productos viables a término, sin que ésta diferencia fuera estadísticamente significativa.

Nuestro grupo se ha centrado en el estudio de las infecciones genitourinarias y su impacto sobre la fertilidad conyugal, en población del noreste de México, encontrando que hasta un 79% de los casos de infertilidad, aborto y fallo de los tratamientos de reproducción asistida están asociados a infección por *Chlamydia trachomatis* y más del 90% se asocian a la presencia de *Ureaplasma urealyticum* tanto en los órganos reproductivos del hombre como de la mujer.

Considerando que los factores de riesgo para adquisición y transmisión del VPH son comunes a las de otras infecciones de transmisión sexual, habrá una amplia posibilidad de que varios de éstos gérmenes coexistan, por tiempo prolongado en los órganos afectados. Dependiendo del tipo de gérmenes implicados podrá haber o no una coincidencia de mayor importancia para la salud reproductiva y el riesgo de cáncer.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Las investigaciones dirigidas al estudio de la asociación del VPH y el desarrollo de cáncer se iniciaron hace más de 4 décadas, pero hasta ahora son pocos los artículos de la literatura que enfocan la importancia del VPH en la fertilidad y las complicaciones obstétricas y aún faltan datos concluyentes al respecto.

Los estudios realizados sobre la importancia de la infección por VPH en la fertilidad no han considerado que las infecciones genitales son generalmente multimicrobianas y, en su mayoría, no descartan la presencia de otros gérmenes comunes en tales condiciones patológicas. Esto pudiera estar generando interpretaciones incorrectas de los datos analizados.

Los estudios sobre la asociación de VPH con *Chlamydia trachomatis* se ha limitado a su efecto cooperador como inductores de cáncer, pero hasta ahora no se ha analizado si esta asociación de gérmenes o alguna otra de la que forme parte el VPH tiene algún impacto en la presentación y evolución clínica de los casos de mujeres con subfertilidad.

Falta también por determinar si se pudiera hacer alguna clasificación de los diferentes genotipos de VPH en función de su impacto sobre el fallo reproductivo, las complicaciones obstétricas y el fracaso de los tratamientos para la recuperación de la fertilidad.

2.2 OBJETIVOS

Primero. Elaborar y analizar una base de datos, generada a partir de expedientes clínicos de mujeres subfértiles con infección genitourinaria en las que se investigó la presencia de Virus del Papiloma Humano.

Segundo. Analizar la frecuencia y distribución de genotipos de VPH y el resto de gérmenes identificados en un grupo de mujeres con infección genital y subfertilidad por factor infeccioso.

Tercero. Evaluar los parámetros clínicos presentes en mujeres con infección genital y subfertilidad por factor infeccioso y su asociación con la presencia del VPH.

Cuarto. Describir la asociación entre los genotipos de VPH y otros gérmenes presentes en mujeres con infección genital y subfertilidad por factor infeccioso, con los antecedentes de pérdida gestacional y fracaso en los tratamientos de reproducción asistida.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

El trabajo se realizó en la consulta especializada de infertilidad y Laboratorio de Andrología SERTOLI Asociados SC en Monterrey, Nuevo León, México y en el Laboratorio de Andrología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en la Ciudad de Monterrey, México, bajo un convenio oficial de colaboración académica oficial firmado por ambas instituciones.

El estudio no fue sometido a aprobación por un consejo de ética institucional debido a que las pacientes proceden de una clínica de fertilidad privada en la que no opera un consejo como tal, pero todas las pacientes firmaron de manera voluntaria un documento en el que se les daba información del trabajo y solicitando su autorización para la utilización de la información contenida en su expediente clínico, incluyendo los análisis de laboratorio practicados como parte de su atención médica y sus resultados.

3.1.1 Casos Incluidos en el Estudio

El grupo de estudio está conformado por mujeres que junto con su cónyuge acudieron a la consulta de infertilidad y Laboratorio especializado de Andrología SERTOLI ASOCIADOS, SC (Monterrey, Nuevo León, México), por infertilidad o aborto repetitivo y con infección genital interna por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasmas* genitales. Se realizó una selección de las pacientes en base a los siguientes criterios:

- Mujeres con fallo reproductivo o incapacidad para procrear.
- Mayores de edad.
- Historia clínica ginecológica.
- Diagnóstico del ADN del VPH y genotipificación en caso de ser positivo.
- Pruebas microbiológicas para detección de *C. trachomatis*, *Mycoplasma sp.* *Ureaplasma urealyticum* y cultivo general en muestras de exudado endocervical.
- Pacientes que aceptaran voluntariamente participar en el estudio y que firmaran el consentimiento informado.

3.1.2 **Número de Pacientes, Base de Datos y Confidencialidad**

Como indica el objetivo principal del estudio, “Describir la asociación de genotipos del Virus de Papiloma Humano de riesgo para cáncer cérvico uterino con *Chlamydia trachomatis* y otros gérmenes, en pacientes con fallo reproductivo”, la finalidad del presente estudio se centra en la descripción de las características de aquellas personas (parejas) que presentan una infección en el aparato reproductor, cuyo germen causante es *Chlamydia trachomatis* y otros gérmenes, asociada a la presencia del VPH. Se ha publicado (Alberts *et al.*, 2013), que la probabilidad promedio (ponderada) para los distintos genotipos de VPH asciende a un 48%. El tamaño muestral necesario para la realización de este trabajo, se determinó aplicando la metodología de estimación de una proporción por intervalos de confianza. Este método nos permitió obtener un número mínimo de muestras a ser estudiadas asegurando que el porcentaje real oscilaría, con una seguridad del 95%, en un intervalo centrado en la proporción ponderada que hemos tomado en cuenta (48%). De acuerdo a esto, la muestra necesaria sería de 93 casos para una confianza del 95% y una amplitud máxima del intervalo del 20%. Este número de casos se incrementaría en un 10% por posibles pérdidas o ausencia de datos en los expediente. La muestra final sería de 102 casos. Finalmente en éste estudio, se incluyeron 104 pacientes que cumplían todos los criterios de selección, a partir de los casos atendidos en la consulta de fertilidad, en un periodo comprendido de enero del 2003 a diciembre del 2014.

Para la realización de este trabajo se planteó un estudio retrospectivo mediante selección de los casos partiendo de la información recogida en la historia clínica de cada una de las pacientes estudiadas. Para ello, se creó una base de datos que permitiera realizar el análisis de la información con el objetivo de estudiar posibles asociaciones entre las características clínicas y los hallazgos de laboratorio. La identificación de cada una de las pacientes se realizó a través de la asignación de una clave de confidencialidad anónima. Los datos de nombres y claves están restringidos y solo tuvieron acceso a esta información el médico especialista y los responsables del proyecto.

3.1.3 *Historia Clínica*

Se realizó el análisis del expediente clínico de cada una de las pacientes incluidas en el estudio a partir del archivo de la institución de procedencia (Sertoli Asociados SC). Se recogieron los siguientes datos para su análisis: parámetros demográficos, antecedentes de fertilidad e infertilidad, pérdidas gestacionales y complicaciones obstétricas, tratamiento contra problemas de infertilidad, antecedentes de lesiones cervicales, antecedentes de procedimientos quirúrgicos, resultados de examen de citología cérvico-vaginal por el método de Papanicolaou, signos y síntomas de infecciones genitourinarias, datos patológicos de la exploración cérvico-vaginal.

3.1.4 *Muestras Biológicas*

Tanto al inicio como en el seguimiento de la atención médica requerida para el diagnóstico y tratamiento de la infección genitourinaria, de cada una de las mujeres incluidas en el estudio, se obtuvieron una o más muestras de exudado cérvico-vaginal. Cuando se consideró necesario, en base a datos de la exploración vaginal, de sintomatología presente o de hallazgos citológicos se investigó, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la presencia de ADN del VPH y su genotipificación (Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la UANL).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 *Detección de Chlamydia en Muestras de Exudado Cérvico-Vaginal*

Se realizó la prueba de IFD anti-*Chlamydia trachomatis* en 104 especímenes de exfoliado cérvico-vaginal de las pacientes incluidas en el estudio posterior a la entrevista clínica. Se utilizó el kit comercial de detección mediante IFD usando anticuerpos monoclonales anti-*Chlamydia trachomatis* (Chlamydia Direct IF Identification kit; BioMérieux, SA. Lyon, Francia). Los anticuerpos empleados en el kit diagnóstico tienen afinidad por la Proteína Mayor de Membrana (MOMP) 15 serotipos de la especie *Chlamydia trachomatis* y permite detectar la bacteria en sus diferentes estadios de evolución: Cuerpos Elementales y Cuerpos Reticulares.

La técnica empleada para tal determinación se describe a continuación:

1. El hisopo con el que se obtuvo la muestra de exfoliado cérvico-vaginal se lavó enérgicamente con 500µL de PBS estéril con el propósito de liberar todo el contenido celular obtenido durante la toma de muestra.
2. Posteriormente las muestras fueron concentradas mediante centrifugación a 12000 rpm durante 20 minutos.
3. El concentrado celular obtenido se resuspendió en 40 µL de PBS estéril, se dispuso sobre un portaobjetos en un área aproximada de 1 cm² y se fijó por desecación; para aumentar el grado de fijación se dispensaron 500 µL de metanol y se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta que se evaporó el excedente.
4. Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo monoclonal fluorescente anti-*Chlamydia trachomatis* durante 30 minutos a temperatura controlada de 25°C y bajo condiciones de humedad, Después se retiró el exceso de reactivo con una solución Buffer PBS (Na₂HPO₄ 2H₂O; KH₂PO₄; NaN₃) a pH 7,2 durante 5 minutos a temperatura ambiente, inmediatamente se lavaron las laminillas con agua destilada durante 5 minutos y se desecaron en incubadora a 37°C durante 15 minutos. Finalmente se colocó el cubreobjetos sellándose con una gota de glicerol.
5. Las muestras se observaron con un microscopio de fluorescencia (Axiostar, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania), empleando objetivo de 63X y ocular de 10X con cifra de campo 18.
6. Para cada observación se verificó la calidad del reactivo procesando un portaobjetos de control negativo y uno de control positivo (*Chlamydia Direct IF(C+/C-)*, BioMerieux, Francia).

Nota: De acuerdo a los fabricantes del Kit diagnóstico, se consideró positivo el resultado de esta prueba cuando se observaron más de 10 cuerpos elementales fluorescentes en el total de la muestra biológica analizada.

3.2.2 Detección de *Mycoplasma sp.* en Muestras de Exudado Cérvico-Vaginal

Para la identificación de ureaplasmas y micoplasmas utilizamos un sistema de identificación bioquímica API, *Mycoplasma IST 2* (BioMerieux, Francia), que contiene los

sustratos específicos para el cultivo e identificación de varias especies de: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma hominis*. Además, mediante este sistema se pudo realizar una cuantificación de la concentración de gérmenes, así como la comprobación de su susceptibilidad a los antibióticos.

El hisopo con el que se obtuvo la muestra de exfoliado cérvico-vaginal se colocó en 3 mL de medio de transporte que contenía peptona en solución de cloruro de sodio 0,65%, para inhibir el crecimiento de gérmenes Gram positivos y Gram negativos. La muestra diluida en el medio de transporte se mezcló con el medio de cultivo liofilizado que contiene los extractos lábiles del medio de cultivo: extracto de levadura, suero de caballo, urea, arginina, rojo fenol como indicador de pH, antibióticos y un antifúngico (para inhibir el crecimiento de flora bacteriana y micótica contaminante de la muestra). Una vez resuspendida la muestra de los pacientes con el liofilizado, se colocó una alícuota de 55 μ L en cada uno de los 16 pocillos de la placa de multipocillos estériles; de este modo se puede realizar el aislamiento, la identificación y la prueba de susceptibilidad de los gérmenes frente a los antibióticos.

La distribución de las muestras en los distintos pocillos fue la siguiente:

Pocillo 1: Control de muestra	Pocillos 8 y 9: Josamicina (2 y 8 mg/L)
Pocillo 2: Identificación de <i>U. urealyticum</i>	Pocillos 10 y 11: Ofloxacina (1 y 4 mg/L)
Pocillo 3: Identificación de <i>M. hominis</i>	Pocillos 12 y 13: Eritromicina (1 y 4 mg/L)
Pocillo 4: Título de <i>U. urealyticum</i> $>0=10^4$ UCC	Pocillos 14 y 15: Tetraciclina (4 y 8 mg/L)
Pocillo 5: Título de <i>M. hominis</i> $>0=10^4$ UCC	Pocillo 16: Pristinamicina (2 y 8 mg/L)
Pocillos 6 y 7: Doxiciclina (4 y 8 mg/L)	

Una vez depositada la muestra en los pocillos, se cubrió cada uno con 2 gotas de aceite mineral estéril para crear un ambiente de anaerobiosis y evitar la evaporación del medio. La incubación se llevó a cabo a 37^o C durante 72 horas para *U. urealyticum* y 5 días para *M. hominis* y *M. fermentans*. Al término del período de incubación, la prueba se consideró positiva para *U. urealyticum* cuando en el pocillo correspondiente el indicador, que originalmente es incoloro, viró a color naranja; en el cultivo positivo para *M. hominis*, el indicador viró a rojo cereza, y, por último, cambió a amarillo intenso en el caso de presencia

de *M. fermentans*. El medio de transporte remanente, formado por peptona en solución salina, debió permanecer transparente; contrariamente, la presencia de turbidez fue indicadora de contaminación.

3.2.3 Detección Molecular del Virus del Papiloma Humano en Muestras de Exudado Cérvico-Vaginal.

Debido a que el estudio abarcó más de 10 años, las técnicas para la detección del VPH aplicadas a los pacientes variaron de acuerdo al método disponible en el momento.

3.2.3.1 Detección Molecular del Virus del Papiloma Humano en Muestras de Exudado Cérvico-Vaginal Mediante PCR- Multiplex

Esta metodología fue utilizada en 34 pacientes pertenecientes a este estudio. La detección del ADN del Virus del Papiloma Humano se realiza específicamente en una región variable entre los distintos genotipos mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando su variante "Múltiplex", que es capaz de detectar un número variable de genotipos dependiendo de la cantidad de cebadores específicos para cada uno de estos, que amplifican una región altamente polimórfica de la proteína L1 del virus que cambia su secuencia según el genotipo viral y mediante el diseño específico de cada cebador para la secuencia específica se logra su genotipificación (Figura 5).

En este estudio se llevó a cabo un ensayo en el cual se determinaban desde 4 a 12 genotipos de alto y bajo riesgo que representan aquellos más frecuentes y detectados a nivel global. Una de las ventajas más importantes de esta técnica es que no se necesitan muchos ciclos de amplificación ya que los distintos pares de cebadores están diseñados especialmente para que puedan aparearse eficientemente a una misma temperatura de esta fase del ciclo. De este modo se acorta mucho el tiempo de amplificación comparado con la búsqueda de cada genotipo por separado.

El análisis de los productos amplificados fue realizado en gel de agarosa al 2% y fue revelado en una cámara de iluminación ultravioleta, utilizando como marcador de ADN el bromuro de etidio.

Para diferenciar los genotipos que se encuentren en la muestra es necesario que los productos amplificados sean de diferente tamaño (lo suficiente como para poder separarlos) y compararlos con un marcador de tamaño molecular certificado (el tamaño del marcador usado fue de 100 pb), esto se logra en base al diseño de los cebadores específicos para cada genotipo.

Los genotipos que amplifican la prueba, y el tamaño de cada uno de estos son:

Genotipo del VPH	Tamaño del Amplicón
6	184 pb
11	233 pb
16	556 pb
18	475 pb
31	340 pb
33	413 pb
52	155 pb
58	295 pb

Si la paciente es portadora de varios genotipos se verán dos o más bandas de amplificación en el gel debido a que cada par de cebadores detecta un genotipo, cuando la muestra se encuentre negativa, no mostrarán banda alguna en la zona de amplificación.

Para la validación de los resultados del ensayo, se llevó a cabo la amplificación de ADN humano en la región del gen de la β -globina para demostrar la buena calidad del ADN extraído de la muestra. Esto se realiza previamente al ensayo de la detección del VPH y la banda de amplificación de este gen siempre debe aparecer en las muestras para certificar la validez del resultado y su tamaño es de 268 pb.

En paralelo a cada muestra analizada se realizó la amplificación de un control positivo de ADN que contiene las secuencias específicas de todos los genotipos del Virus del Papiloma Humano investigados en esta metodología, esto para certificar el correcto funcionamiento de los cebadores diseñados, así como del programa de amplificación. Por lo

que al usar este control, se observarán bandas de amplificación en cada uno de los distintos tamaños de los amplicones que generan los cebadores.

3.2.3.2 Detección Molecular del Virus del Papiloma Humano de los Exudados Cérvico – Vaginal por PCR – Dual Priming Olinucleotide (DPO)

Esta fue la técnica aplicada en el caso de 36 pacientes de este estudio en la que a las muestras de exudado cérvico-vaginal se les llevo a cabo una extracción de ADN y después se les realizó la determinación de la presencia del Virus del Papiloma Humano mediante la amplificación de su ADN por la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando la tecnología DPO™ que emplea cebadores de una longitud aproximada de 36 pares de bases, lo que le da una mayor especificidad. Estos cebadores amplifican la región altamente polimórfica de la proteína L1 viral que cambia su secuencia con respecto al genotipo, por lo que es necesario diseñar estos cebadores para cada genotipo que se desee estudiar. Como un cebador tan largo no puede aparearse a una temperatura adecuada para este paso del ciclo (máximo 68°C) se le agrega una secuencia consecutiva de 5 moléculas de inositol en una parte intermedia del cebador para que la temperatura de alineamiento pueda bajar y así lograr este fenómeno. Esta característica hace que el número de cebadores utilizados en una misma reacción pueda ser mayor, ya que su especificidad también lo será, por lo tanto, es posible detectar más genotipos en una sola corrida, comparándolo contra una PCR – Multiplex convencional.

Los genotipos investigados bajo esta metodología van de 14 hasta 19, estos genotipos son tanto de alto riesgo como de bajo riesgo y los productos amplificados en las muestras positivas fueron analizados por la técnica de electroforesis capilar por medio del equipo “Applied Biosystems 3130 series genetic analyzer systems”, esta técnica tiene diversas ventajas comparada contra los geles normales de electroforesis como lo es la inyección electrocinética de las muestras para cargarlas en el sistema en menos de 30 segundos y que utiliza mucha menor cantidad de producto amplificado que en un gel aunado a que el sistema de detección es muy sensible que es capaz de discernir la secuencia de un determinado amplicón en términos de base por base y es capaz de medir el tamaño de éste, con esto logra distinguir entre las diversas señales generadas en una misma muestra. Todas

estas ventajas se representan en la eliminación de operaciones manuales que resulta en reacciones consistentes y reproducibles entre una y otras, y sobre todo el ahorro del tiempo usado en el análisis electroforético.

Acoplado al sistema de electroforesis capilar, se encuentra el software GeneMapper®, que es una herramienta que se aplica para analizar los fragmentos amplificados ya que es posible identificar los distintos genotipos y tamaño de fragmentos así como los polimorfismos de un solo nucleótido mediante la comparación con una base de datos hecha para establecer la autenticación de los fragmentos amplificados por las secuencias y la longitud de dichos fragmentos. Todos los valores de calidad son aplicados a cada fragmento analizado para la correcta automatización y respuesta estable y los fragmentos cuestionables son fácilmente reconocidos.

De manera que si la muestra resulta positiva para alguno de los genotipos investigados por esta metodología, el software GeneMapper® lo identificará y lo marcará como presente, no sin antes haber evaluado la correcta extracción del ADN detectando el gen de la β -Globina para la validación del ensayo.

3.2.3.3 Detección Molecular del Virus del Papiloma Humano Mediante la Técnica de Hibridación con Sondas Oligoespecíficas

En 34 pacientes se aplicó esta metodología donde a las muestras de exudado cérvico-vaginal tomadas se les extrajo ADN para determinar la presencia del Virus del Papiloma Humano. A continuación, se llevó a cabo la detección de la región L1 que es un segmento del genoma del Virus altamente polimórfico mediante la técnica de PCR, utilizando los cebadores MY09 y MY11 que crean un amplicón de 450 pares de bases de dicha región, esta amplificación es útil para identificar la presencia o ausencia del VPH (Figura 5).

Posteriormente, el producto amplificado de las muestras se tipificó utilizando la hibridación reversa de dichos productos empleando sondas oligoespecíficas que identifican desde 20 hasta 28 distintos genotipos del Virus del Papiloma Humano entre los que se encuentran los genotipos de alto y bajo riesgo más frecuentes a nivel global. Dicha técnica utiliza el acoplamiento de una sola cadena de un fragmento del producto amplificado, lo que

se logra mediante la desnaturalización de dicho ADN. Una vez realizado esto, se dispone a insertar una cantidad determinada en cada pocillo de la tirilla que contenga la secuencia oligoespecífica para cada genotipo, como estas sondas están biotiniladas, si alguna de ellas llegará a hibridar, es decir, acoplarse con la secuencia complementaria proveniente del producto amplificado de la muestra, la biotina se va a conjugar y será posible revelarla. Por tanto, si una muestra resulta positiva para alguno de los genotipos investigados con esta prueba, quedará evidenciado por la formación de color en la zona donde se encuentra la sonda específica de dicho genotipo.

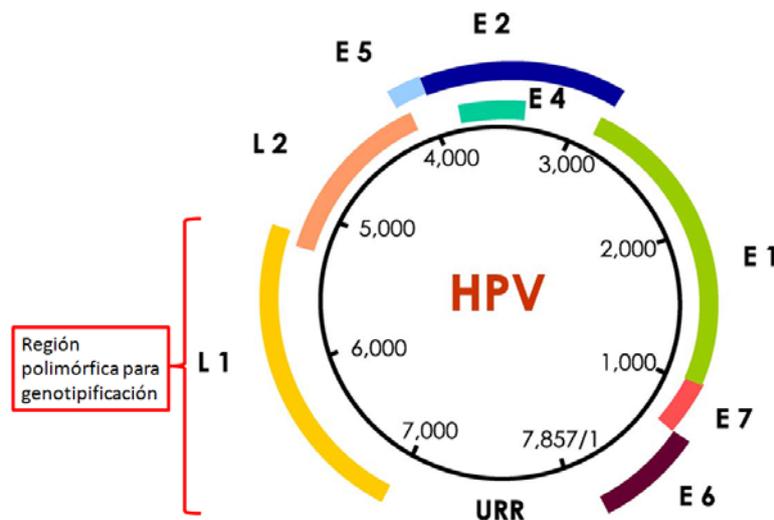


Figura 5. Esquema del genoma del VPH señalando la región utilizada para su detección y genotipificación (Muñoz *et al.*, 2006).

Todos los resultados de las muestras analizadas fueron validados por la amplificación del gen de la β -globina al que se realizó de igual manera la hibridación reversa en las tirillas utilizadas como control de la buena extracción del ADN.

3.2.4 *Análisis Estadístico*

Como se ha señalado anteriormente, se creó una base de datos informatizada utilizando el programa Excel (Microsoft Office, Versión 2007). Los datos fueron recogidos de la historia clínica y de las pruebas de laboratorio. Una vez depurada la base de datos se realizó el análisis estadístico.

3.2.4.1 Estadística Descriptiva

Las variables cualitativas se resumieron mediante el cálculo de frecuencias absolutas para cada modalidad y relativas expresadas en porcentajes. En el caso de variables cuantitativas, se procedió al cálculo de medidas de tendencia central media y/o mediana y de dispersión desviación estándar. Las representaciones gráficas utilizadas estuvieron en función del tipo de variable diagrama de barras o sectores en el caso de variables cualitativas e histograma en el caso de variables cuantitativas.

3.2.4.2 Inferencia Estadística

Se calcularon los intervalos de confianza al 95% para las variables clínicas que consideradas como principales por su relación con el objetivo principal del trabajo.

Para evaluar la hipótesis principal se aplicará el test Z de Fisher para un nivel de significación $p \leq 0,05$ y una potencia $(1-\beta)$ del 80%. Para el cálculo de los distintos estadísticos se utilizará el programa SPSS versión 20. (SPSS Inc.)

4. RESULTADOS

Los resultados que a continuación se presentan, fueron obtenidos cumpliendo el objetivo primero de éste trabajo, mediante el análisis de la base de datos generada a partir de las historias clínicas de pacientes problemas en la función reproductiva y con infección genitourinaria, en las que se investigó la presencia del Virus del papiloma Humano (VPH); la población estudiada se describe en el primer punto de éste capítulo.

En segundo término, se presentarán la frecuencia de los gérmenes presentes en las muestras analizadas, al momento de hacer la prueba de VPH, desde un aspecto puramente descriptivo, presentando datos individualizados de las frecuencias de cada uno ellos.

Posteriormente haremos referencia a las características clínicas del grupo estudiado y de la comparación y la correlación de los datos clínicos de las pacientes, de acuerdo al resultado de la prueba de VPH.

Continuaremos luego describiendo los genotipos del alto y bajo riesgo de VPH encontrados; las asociaciones entre diferentes genotipos de VPH presentes; las asociaciones de los genotipos de VPH encontrados, con otros gérmenes presentes en la muestra de pacientes seleccionadas. Por último describiremos los genotipos VPH presentes en los subgrupos de mujeres que han referido haber tenido una o más pérdidas gestacionales (aborto) con o sin procedimientos de reproducción asistida.

4.1. PACIENTES SELECCIONADAS

El universo de éste estudio fue una serie de 690 parejas que se atendieron en la consulta de infertilidad conyugal, en el periodo comprendido de diciembre del 2003 a diciembre del 2014. Las pacientes fueron seleccionadas de manera aleatoria, como se refiere en el capítulo de Material y Métodos. Así, se constituyó una muestra representativa, formada por 104 historias clínicas de mujeres que cumplían los criterios de inclusión y que firmaron el consentimiento informado, para el uso estadístico de los datos clínicos y de laboratorio.

De las 104 pacientes estudiadas, el 76% presentaba algún trastorno reproductivo; 65 mujeres tenían diagnóstico de infertilidad primaria, es decir, no habían logrado procrear ningún hijo a pesar de los tratamientos recibidos y 13 padecían infertilidad secundaria, ya

que, al tiempo de llegar a esta consulta tenían al menos un hijo y deseaban lograr otro embarazo. De estas pacientes subfértiles, 53 habían estado en tratamientos de fertilidad sin éxito y fueron referidas para estudio y manejo médico del factor masculino, demostrándose, en el análisis seminal, la presencia de procesos infecciosos.

En el total de pacientes consideradas para éste análisis, 6 pacientes (5,7%), que durante su vida reproductiva no habían logrado la procreación, habían sido hysterectomizadas por infecciones recurrentes y resistentes a tratamiento, que siguieron padeciendo a pesar de la hysterectomía, motivo por el cual acudieron a esta consulta. Tres mujeres incluidas en este estudio se encontraban en la menopausia (2,88%), otras 3 se encontraban en edad fértil pero no buscaban embarazo y 5 más, que eran mujeres jóvenes estudiantes con o sin pareja estable, requirieron atención médica por infección genitourinaria recurrente (Tablas I y II).

Como parte de los procedimientos necesarios para la atención médica solicitada, a las pacientes se les había practicado exploración vaginal y con los datos de las observaciones hechas respecto al estado de las paredes vaginales, el fondo de saco vaginal, la posición del cuello uterino y el aspecto de su superficie externa, el diámetro de apertura del orificio cervical externo, la permeabilidad del conducto cervical y las características de las secreciones encontradas en cada sitio explorado, se elaboró un registro electrónico para el análisis estadístico.

4.2 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

A todas las pacientes se les había realizado uno o más muestreos de exudado cérvico vaginal y exfoliado endocervical, por los métodos de hisopado y cepillado. Las muestras biológicas se procesaron con los métodos descritos en el capítulo anterior de esta tesis resultando 90 casos positivos (86,5%) para *Chlamydia trachomatis*, 49 casos frente a *Ureaplasma urealyticum* y 37 para *Mycoplasma hominis*. Mediante cultivo general fueron identificados: *Enterococcus faecalis* (10,6%), *Escherichia coli* (20,2%), *Cándida albicans* (17,3%), *Pseudomona aeruginosa* (2,9%), *Citrobacter freundii* (1,9%) y *Proteus mirabilis* (1%). En la mayoría de las muestras analizadas la microbiota vaginal estaba ausente (52,9%) o disminuida (24%). Estos resultados microbiológicos se resumen en la Figura 6.

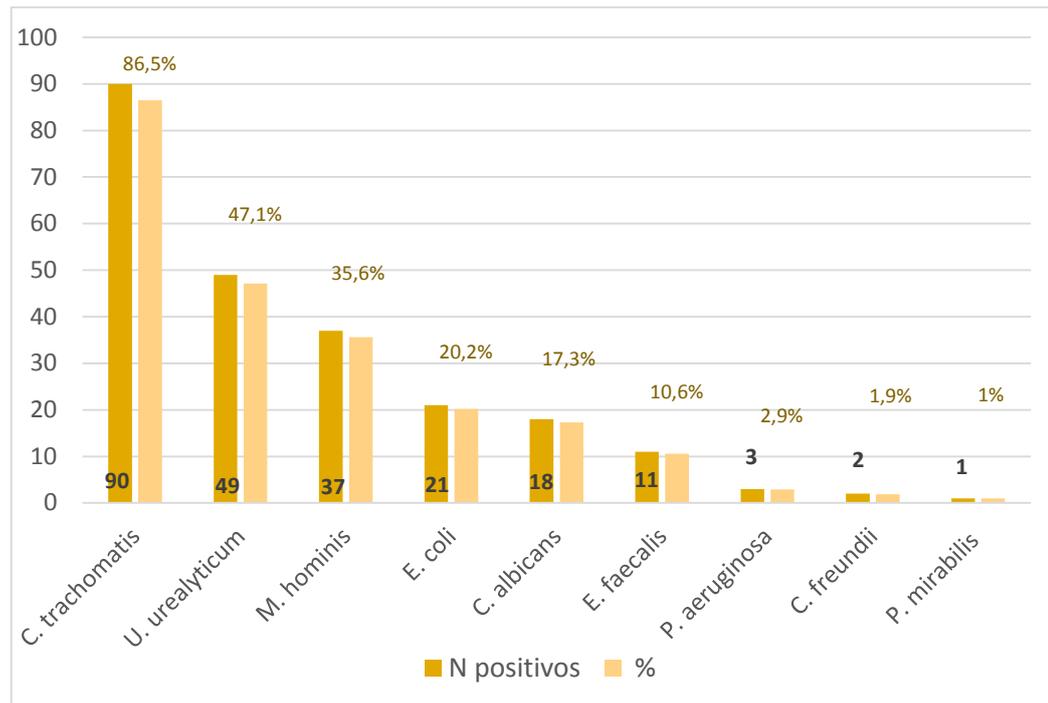


Figura 6. Distribución de microorganismos diagnosticados en el exudado cérvico vaginal.

Las figuras 7 y 8 presentan ejemplos de las pruebas positivas para *C. trachomatis* y *U. urealyticum*. Ya fuera por sospecha clínica o por observaciones citológicas sugestivas de presencia viral, se procedió a la identificación de VPH mediante técnica de PCR. En 49% de las mujeres el resultado de esta prueba fue positivo, predominando en frecuencia los tipos VPH 6 (19,2%), VPH 18 (12,5%), VPH 16 (11,5%), VPH 58 (7,2%). Estos resultados se ampliarán en el apartado 4.4 de ésta tesis.

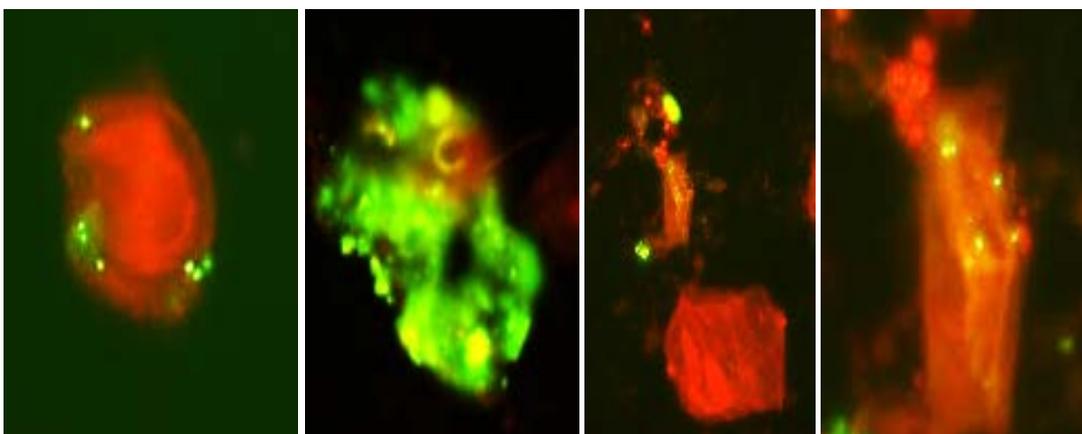


Figura 7. Detección de *C. trachomatis* con anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína (verde amarillento) contrastados con azul de Evans. Microscopía de Fluorescencia, 63x.

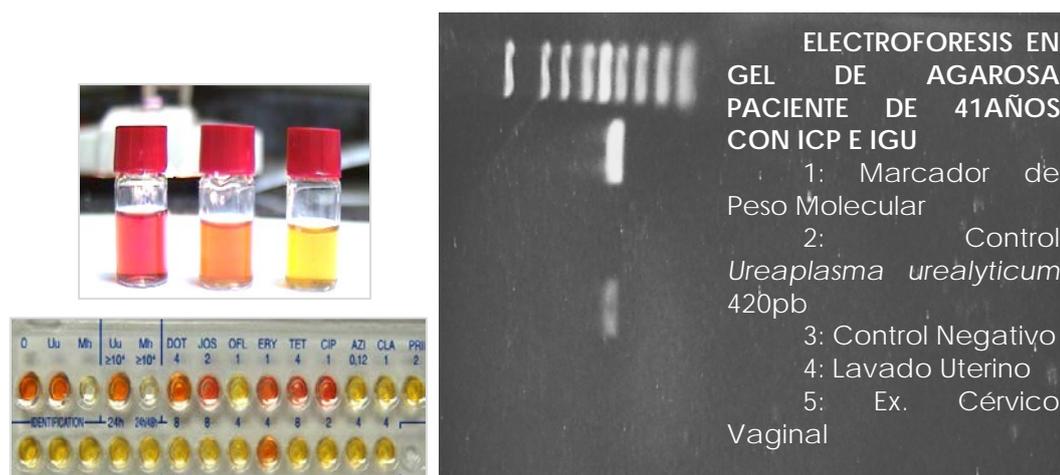


Figura 8. Identificación microbiológica de *Ureaplasma urealyticum* en exudado cérvico vaginal y endocervical, Cultivo positivo para *U. urealyticum*. Sistema de identificación bioquímica “Mycoplasma IST 2”. Abajo: Identificación del gen de *Ureaplasma urealyticum* en líquido de la cavidad uterina, en una paciente infértil, con VPH 6 y 16 y *C. trachomatis* en el exudado cervical.

4.3 DATOS CLÍNICOS

4.3.1 Antecedentes Ginecológicos

Entre los antecedentes ginecológicos, la edad media de la menarca de toda la muestra fue de $12,1 \pm 2,4$. La media del grupo global de la edad de inicio de vida sexual activa fue de $22,3 \pm 6,1$ años (mínimo 16 y máximo 40 años); 37 de las mujeres (35,6%), refirieron haber tenido más de dos parejas desde el IVSA y 67 (64,4%) dijeron tener solo una pareja sexual (Tablas I y II).

Tabla I. Descripción de pacientes.

	Toda la Serie Media \pm DS	VPH Positivo Media \pm DS	VPH Negativo Media \pm DS	P
Edad	32,6 \pm 6,6	31,9 \pm 6,4	33,3 \pm 6,7	0,28
Edad de Menarca	12,1 \pm 2,4	11,9 \pm 2,6	12,4 \pm 2,2	0,46
Edad de IVSA	22,3 \pm 6,1	21,4 \pm 6,5	23,1 \pm 5,5	0,17

IVSA: Inicio de Vida Sexual Activa.

El tipo de actividad sexual referida con mayor frecuencia fue el coito vaginal (82,7%); 17 pacientes refirieron relación sexual extra vaginal oral (felatio) y ninguna mencionó haber tenido relación sexual anal. Treintaiséis de las pacientes declararon nunca haber usado preservativo en la relación sexual y 65, habían hecho uso del preservativo a menudo pero no siempre. El consumo de alcohol y/o tabaco no fueron hábitos frecuentes en el grupo de estudio: 13 pacientes ingerían bebidas alcohólicas ocasionalmente y 12 mujeres consumían tabaco, sin llegar a ser fumadoras, ni adictas al alcohol. Estos datos aparecen resumidos en la Tabla II.

Tabla II. Motivo de consulta y hábitos de riesgo para ITS.

	Toda la Serie		VPH Positivo		VPH Negativo		P
	N	%	N	%	N	%	
Consulta por infertilidad primaria	51	79,0	25	49	26	49,1	0,70
Consulta por infertilidad secundaria	13	12,5	5	9,8	8	15,1	0,70
Consulta por infección genitourinaria	40	38,5	21	41,2	19	35,8	0,70
Se presenta con infección genitourinaria activa	67	64,4	39	76,5	28	52,8	0,01
Consume tabaco	12	11,8	8	16,3	4	7,5	0,22
Consume alcohol	13	12,6	5	10,0	8	15,1	0,56
Toma desinflamatorios	5	4,8	3	5,9	2	3,8	0,14
Toma antibióticos	2	1,9	2	3,9	0	0,0	0,14
Toma hormonales	8	7,7	6	11,8	2	3,8	0,14
Una sola pareja	67	64,4	28	54,9	39	73,6	0,05
Más de dos parejas	37	35,6	23	45,1	14	26,4	0,05
Solo coito vaginal	86	82,7	42	82,4	44	83,0	0,88
Rel. sexual extravaginal	17	16,3	9	17,6	8	15,1	0,88
Nunca usa preservativo	36	35,6	21	42,0	15	29,4	0,22
A veces usa preservativo	65	64,4	29	58,0	36	70,6	0,22

ITS: Infección de Transmisión Sexual.

El 67,4% de las mujeres seleccionadas para éste estudio se presentaron refiriendo una infección genitourinaria activa, pero solo 4 recibían alguna medicación en ese momento: 2 toman algún antiinflamatorio, 2 tomaban algún antibiótico y 4 estaban bajo algún tratamiento hormonal (Tabla II). Entre los antecedentes clínicos destacaron la presencia de episodios reincidentes de inflamación vaginal en el 71,2% de las pacientes; uretritis en el 58,7%; en menor proporción (25,2%), irregularidad de los ciclos menstruales y sangrados intermenstruales en un 13,5%. La prescripción de tratamientos previos para IGU fue referido sólo en 31 pacientes, que, en general, consistieron en la aplicación tópica intravaginal de antibióticos, principalmente antimicóticos; 18 habían sido tratadas con criocirugía por ulceración cervical y 6 tenían histerectomía. Como parte de los procedimientos de estudio de factores causales del fallo reproductivo, en nueve pacientes se practicó laparoscopia pélvica exploratoria, con el hallazgo de endometriosis en 8 casos (7,7%) y de proceso adherencial en una paciente. En nueve pacientes (8,7%) se demostró mediante histerosalpingografía obstrucción tubárica unilateral y bilateral en una paciente (Figura 9). La prueba de STORCH no arrojó resultados anormales en las 11 pacientes a las que les fue practicada (Tabla III).

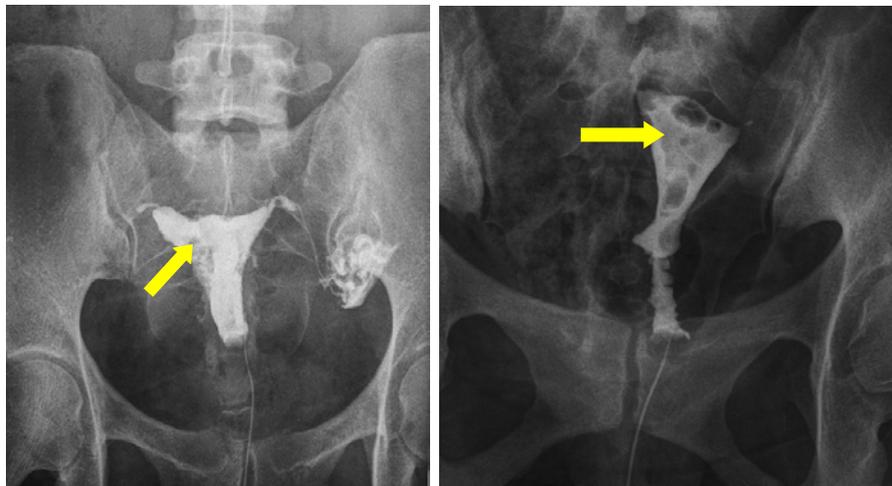


Figura 9. Histerosalpingografías de dos pacientes de este estudio, con obstrucción tubárica unilateral en la imagen de la izquierda y bilateral en la de la derecha, en ésta además se aprecian sinequias uterinas (flechas), como secuelas cicatriciales de la infección uterina crónica asociadas a subfertilidad.

Tabla III. Antecedentes ginecológicos clínicos y quirúrgicos.

	Toda la Serie		VPH Positivo		VPH Negativo		P
	N	%	N	%	N	%	
Infecciones vaginales	74	71,2	37	72,5	37	69,8	0,83
Infecciones urinarias	61	58,7	29	56,9	32	60,4	0,84
Infección por <i>Chlamydia</i>	25	24,0	11	21,6	14	26,4	0,65
Infección por <i>Gonococo</i>	1	1,0	1	2,0	0	0,0	0,50
Infección por VPH	46	44,2	33	64,7	13	24,5	0,0001
Criocirugía de úlcera cervical	18	17,6	8	16,3	10	18,9	0,79
Ciclos irregulares	26	25,2	11	21,6	15	28,8	0,39
Sangrado intermenstrual	14	13,5	8	15,7	6	11,3	0,57
Obstrucción tubaria unilateral	9	8,7	4	7,8	5	9,4	0,85
Obstrucción tubaria bilateral	1	1,0	1	2,0	0	0,0	0,85
Endometriosis	8	7,7	2	3,9	6	11,3	0,27
Adherencias pélvicas	1	1,0	1	2,0	0	0,0	0,50
Histerectomía	6	5,8	2	3,9	4	7,5	0,43
STORCH	11	10,7	3	6,0	8	15,1	0,2
Pap.inflamación leve/moderada	33	32,0	21	41,2	12	23,1	0,05
Pap.inflamación/metaplasia	27	26,5	16	32,0	21	21,2	0,26
Pap. Displasia leve	7	7,1	4	8,2	3	6,1	1,0

Pap: Citología de Papanicolaou.

En los años previos a este estudio, a 102 pacientes se les había practicado citologías cérvico-vaginales estudiadas por Pap. En 33 casos (32%), se informaron cambios de inflamación leve a moderada, en 27 pacientes (26,5%) metaplasia y 7 (6,9%) presentaron “displasia leve”. El resto de los reportes de las citologías que les fueron practicadas no reportaron cambios patológicos. En la Tabla III y en la Figura 10 se ilustran cambios citopáticos en las pacientes en la citología en fresco y el Papanicolaou.

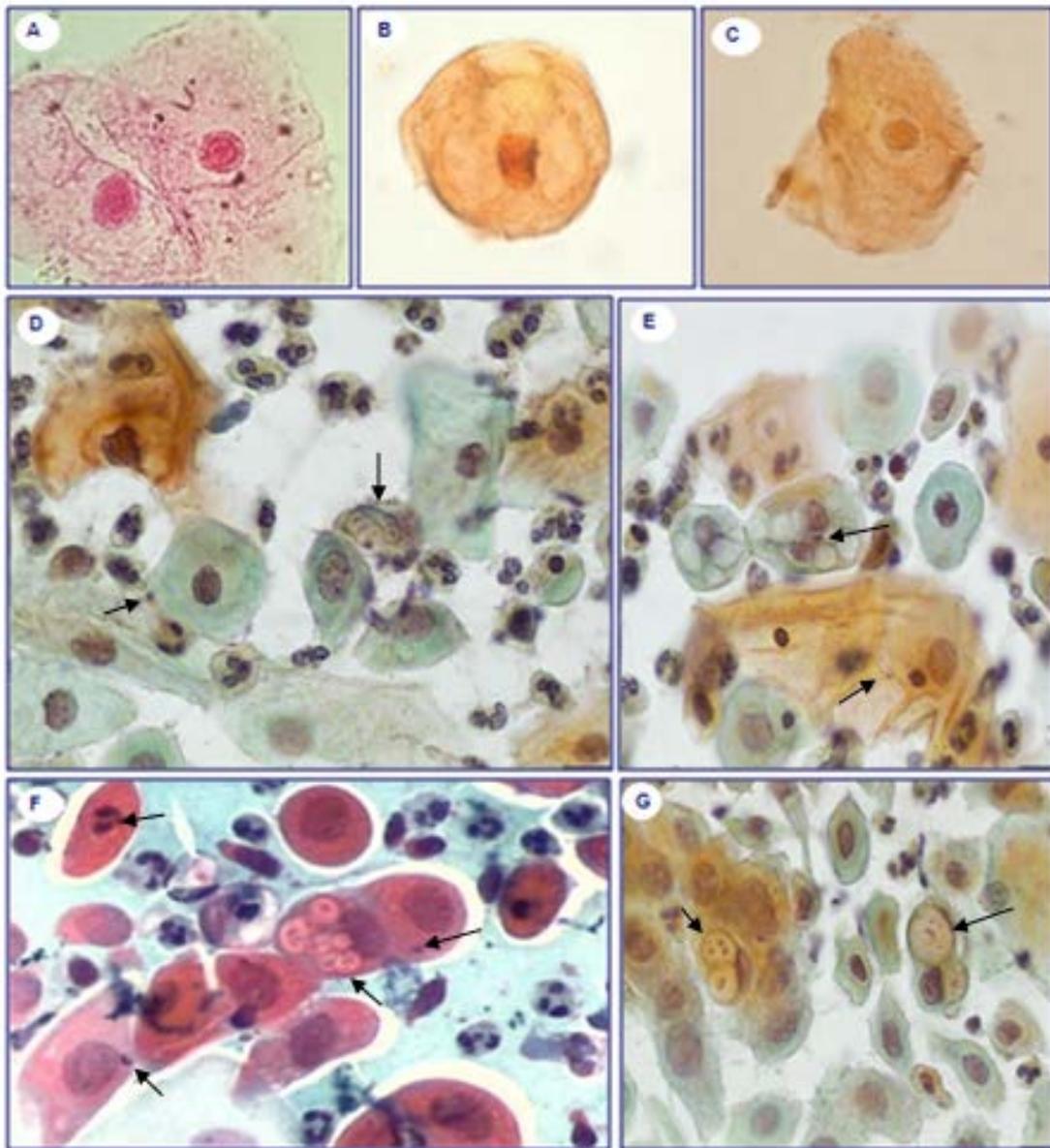


Figura 10. A, B y C: Células epiteliales con inclusiones bacterianas, observación citológica en fresco. En A tinción con eosina Y. En B y C: Coilocitos, tinción con rojo neutro. En D a G: imágenes representativas de citología con tinción de Papanicolaou en base líquida. La presencia de bacterias intracelulares se indica con flechas.

Cuarentaiséis de las pacientes que se incluyeron en el estudio (44,2%) refirieron en la entrevista clínica tener citologías practicadas con anterioridad que informaron la presencia de metaplasia escamosa, y de “coilocitos” en la biopsia de cérvix, realizada ante el diagnóstico sugestivo de infección por “VPH” mediante colposcopia (Figura 11). El antecedente de diagnóstico de laboratorio de infección por clamidia fue referido por 25 pacientes, solo una refirió infección gonocócica previa.

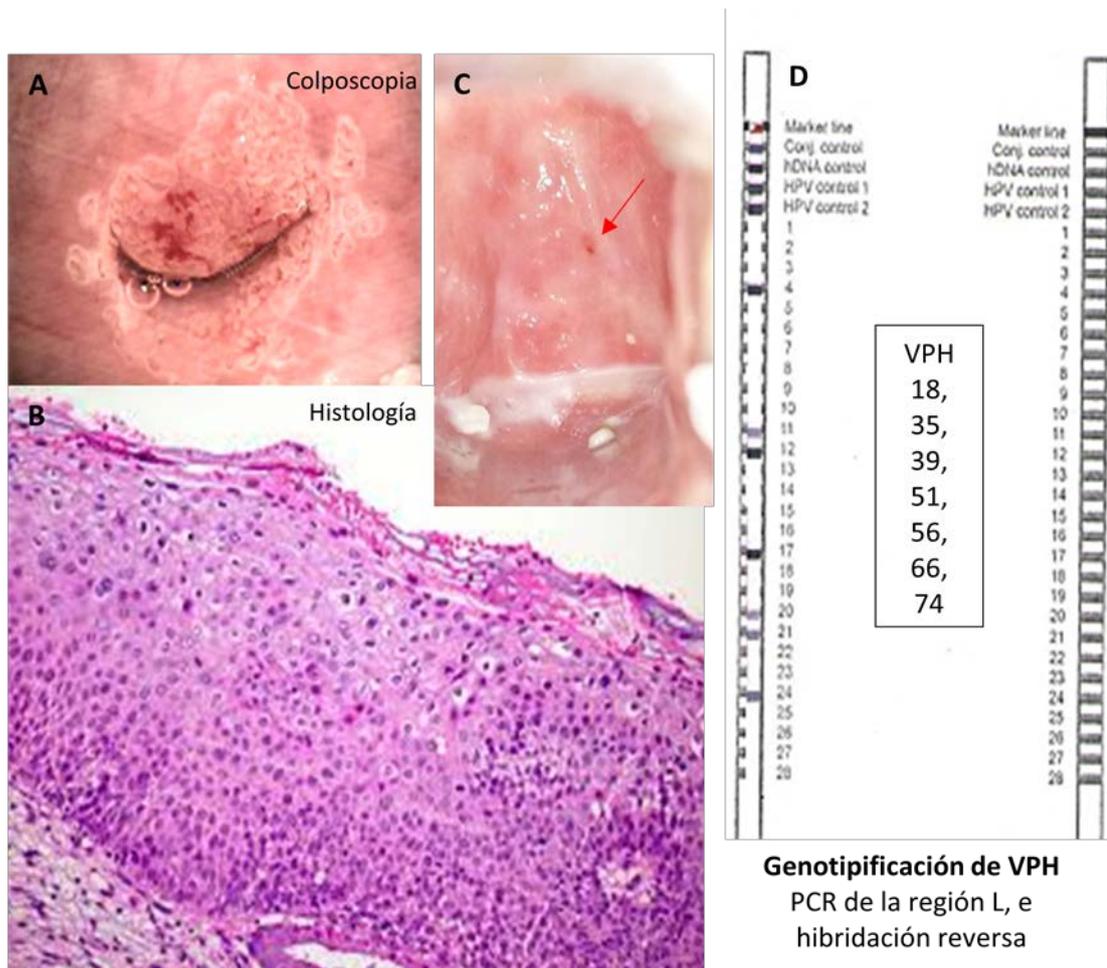


Figura 11. Paciente de 34 años de edad con antecedente de 5 IIU y 3 FIV/ICSI. Fue referida para atención de IGU recurrentes y resistente a tratamientos, un año después de haber sido hysterectomizada Colposcopia anormal (A), Coilocitos en una lesión CIN I (B), Lesión en cúpula vaginal (C). Los VPH 18, 35, 39, 51, 56, 66 y 74 se detectaron en la secreción del fondo de saco vaginal (D).

4.3.2 Antecedentes Reproductivos

En cuanto a tratamientos para la infertilidad, observamos que 53 pacientes habían recibido algún tipo de procedimiento de reproducción asistida, incluyendo bajo éste concepto las inseminaciones intrauterinas y las técnicas fertilización *in vitro* e inyección intracitoplásmica de espermatozoides. En 38 de esas 53 pacientes (71,7%), se realizaron entre una a cinco inseminaciones intrauterinas (IIU); en su mayoría (76,3%) se llevaron a cabo dos o más de estos procedimientos. La cifra total de inseminaciones intrauterinas que se realizaron en el grupo de pacientes estudiadas fue de 81. En el 28,3%, que corresponde a 15 de las 53 pacientes con tratamientos de reproducción asistida, se realizaron fertilización *in vitro* y/o ICSI en una o dos ocasiones. Ninguno de los 97 procedimientos de IIU y FIV/ICSI

que se habían llevado a cabo en total en las mujeres incluidas en esta investigación, fue exitoso para el logro de un embarazo a término. A pesar de que inicialmente se detectó embarazo como resultado en 4 de los 97 procedimientos, la gestación no prosiguió más allá de la sexta semana, resultando ser la tasa de éxito de 0% (Tabla IV).

Tabla IV. Tratamientos de reproducción asistida y pérdidas gestacionales.

	Pacientes Subfértiles		VPH Positivo		VPH Negativo		P
	N	%	N	%	N	%	
Total con Tratamiento	53	100	31	58,49	22	41,5	0,48
Total con IIU	38	100	20	52,6	18	47,4	0,48
1 IIU	9	23,7	3	15,0	6	33,3	0,26
≥ 2 IIU	29	79,3	17	85,0	12	66,78	
Casos con FIV/ICSI	15	100	11	73,3	4	26,7	0,002
Total/Pérdida gestacional	31	100	15	48,4	16	51,6	0,42
1 Aborto	12	38,7	6	40,0	6	37,5	0,75
≥ 2 Aborto	16	51,6	7	46,6	9	56,2	
Con muerte fetal intrauterina	3	9,7	2	13,4	1	6,3	

IIU: Inseminación Intrauterina; FIV: Fertilización In Vitro; ICSI: Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides.

Entre las complicaciones obstétricas, encontramos que de las pacientes estudiadas, 28 (27,5%) refirieron haber sufrido al menos una pérdida en el primer trimestre de la gestación (aborto temprano), como parte del problema de fertilidad. Doce de esas pacientes habían tenido una sola pérdida gestacional y 16 tenían dos o más interrupciones espontáneas del embarazo: 6 mujeres dijeron haber tendido dos abortos previos, 9 refirieron tres abortos consecutivos y una paciente presentó antes de llegar a nuestra consulta, 4 abortos. Otra complicación obstétrica grave encontrada en la muestra de mujeres que se incluyeron en éste estudio, fueron 7 gestaciones con muerte fetal intrauterina: dos pacientes con 3 y otra paciente con una (Tabla IV).

4.3.3 Datos Clínicos y Exploración Física

El 93% de las pacientes estudiadas refirieron la presencia simultánea de parámetros clínicos considerados indicativos de un proceso infeccioso genital y urinario activo. Destacó la presencia de dolor pélvico, referido a ambas fosas iliacas o al hipogastrio, de intensidad moderada a severa, que estuvo presente en el 69,9% de las mujeres incluidas en el presente estudio.

En poco más de la mitad de estas pacientes, el dolor apareció en fase menstrual, perimenstrual o periovulatoria y era constante a lo largo de casi todo el ciclo menstrual en 14,6% de las pacientes, que lo señalaron como un síntoma predominante en su padecimiento y lo diferenciaron de lo que identificaban como cólico menstrual intenso o muy intenso, que estuvo presente en el 24,6% de los casos. La Figura 12 y la Tabla V presentan estos datos y algunas otras condiciones patológicas que las pacientes asociaron con la infección.

Entre los síntomas de infección urinaria el más frecuente fue la disuria, presente en 53 de las pacientes (49,1%) que en su mayoría (36,5%). Otros síntomas urinarios como la poliuria y la hematuria refirieron fueron poco observados. El 21,4% de las mujeres presentaron poliuria en grado leve. Solo dos pacientes refirieron hematuria como parte del cuadro clínico. La Figura 12 y la tabla V presentan los datos concentrados de estas observaciones.

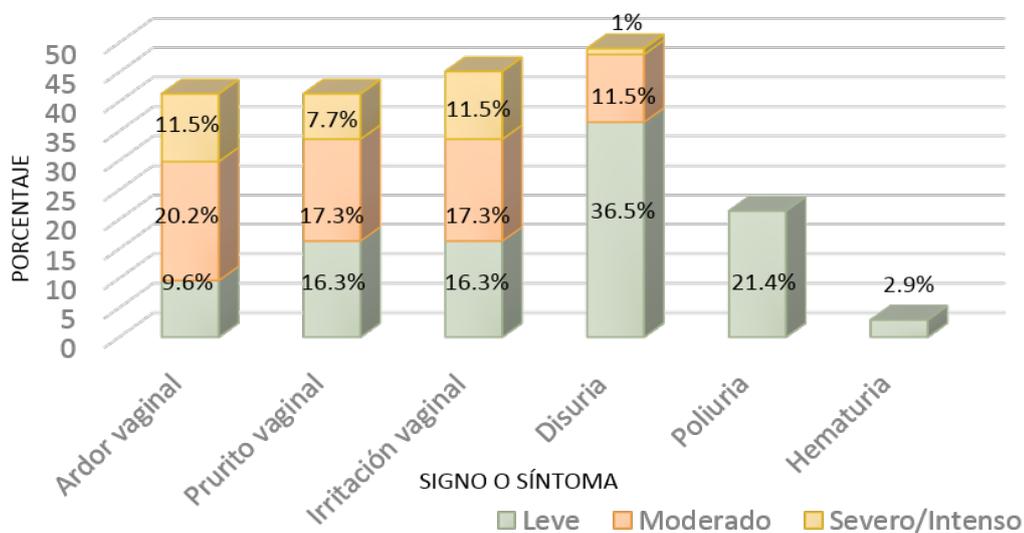


Figura 12. Síntomas y signos de infección genitourinaria.

Tabla V. Signos y síntomas de infección genitourinaria.

	Toda la Serie		VPH Positivo		VPH Negativo		P
	N	%	N	%	N	%	
Disuria ocasional	51	49,0	28	54,9	23	43,4	0,32
Disuria leve	38	36,5	21	41,2	17	32,1	0,57
Disuria moderada	12	11,5	6	11,8	36	11,3	0,57
Disuria severa	1	1,0	1	2,0	0	0,0	0,57
Hematuria	2	1,9	2	3,9	0	0,0	0,24
Poliuria	22	21,4	14	27,5	8	15,4	0,5
Vulvovaginitis leve	17	16,3	9	17,6	8	15,1	0,88
Vulvovaginitis moderada	18	17,3	9	17,6	9	17,0	0,88
Vulvovaginitis severa	13	12,5	5	9,8	8	15,1	0,88
Prurito vaginal leve	10	9,6	5	9,8	5	9,4	0,92
Prurito vaginal moderado	21	20,2	10	19,6	11	20,8	0,92
Prurito vaginal severo	12	11,5	7	13,7	5	9,4	0,92
Ardor vaginal leve	11	10,6	4	7,8	7	13,2	0,82
Ardor vaginal moderado	22	21,2	11	21,6	11	20,8	0,82
Ardor vaginal intenso	14	13,5	8	15,7	6	11,6	0,82
Dolor/inflamación pélvica							
- Leve	23	22,3	14	28,0	9	17,0	0,16
- Moderada	31	30,1	16	32,0	15	28,3	0,16
- Severa	18	17,5	10	20,0	8	15,1	0,16
- Perimenstrual	45	47,3	27	52,9	18	34,6	0,16
- Periovulatoria	11	10,7	7	13,7	4	7,7	0,09
- Constante	15	14,6	5	9,8	10	19,2	0,09

La presencia de leucorrea, con irritación vulvar (46,2%), con ardor vaginal (45,3%) y/o con prurito vaginal (41,3%) fue un signo referido reiteradamente por todas las pacientes durante la entrevista clínica, aunque muchas, bajo su percepción subjetiva y sin un punto de referencia, lo consideraban “normal”.

En cuanto a las características de la descarga transvaginal espontánea de secreción que comentaron las pacientes, el 83,4%, la describían como un material semilíquido,

mucoso, viscoso e incluso hiperviscoso, de color blanco (85,7%), amarillento (59,4%) o cristalino ligeramente amarillento, que en algunos casos fue de apariencia filante (Figura 13); éste último dato fue referido por las pacientes coincidiendo con el período ovulatorio, en la exploración cervical, pero se observó también en la fase pre menstrual en 47,2% de los casos.

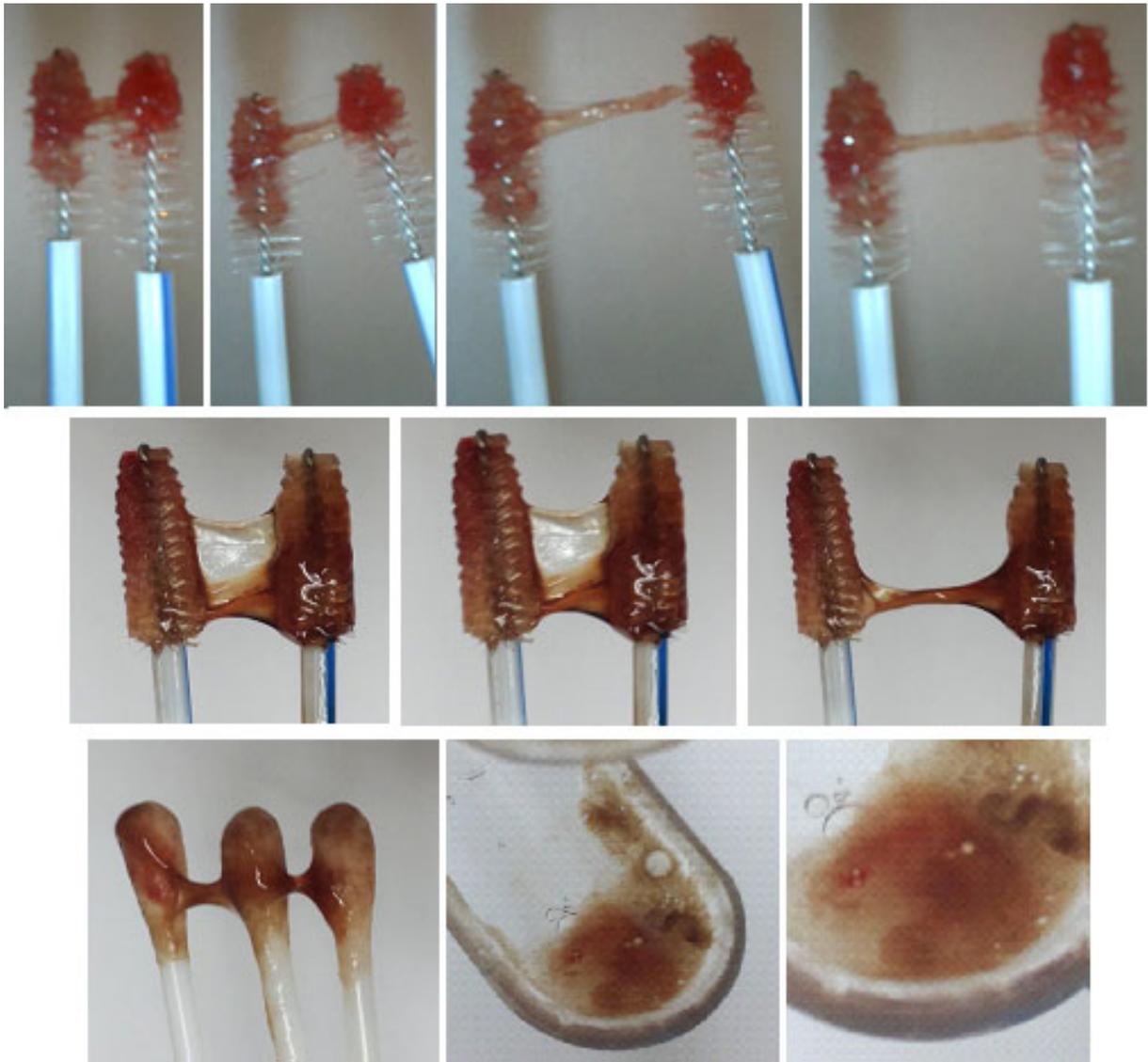


Figura 13. En la fila superior y media, cepillo citológico con secreción tomada del conducto cervical. En la primera fila se muestra la consistencia hiperviscosa o filante de una secreción semitransparente amarillenta y de aspecto hemático obtenida del conducto cervical. Las imágenes de la fila media e inferior muestran el tipo de secreción encontrada en la endocervicitis y endometritis: un moco de color café claro a oscuro presente con mayor frecuencia en el período perimenstrual (92,7%) y periovulatorio (51,9%).

Mediante un interrogatorio intencionado se investigaron las características particulares del sangrado menstrual, que pudieran asociarse a la infección endometrial. De ese modo, las pacientes reconocieron cambios menstruales que se establecieron gradualmente a los largo de meses o años y por ello no los consideraron como anormales.

El cambio más frecuentemente referido por las pacientes fue respecto al color del sangrado menstrual. El color original, rojo claro brillante, aún era observado por 16,3% de las pacientes, mientras había cambiado a rojo oscuro, en el 23,9% de la mujeres y a color café rojizo o marrón en el 20,7% de las pacientes.

Treinta y seis de las mujeres (39,1%) describieron su sangrado menstrual como anormal, por ser de color café muy oscuro del que se desprende un olor desagradable, presente en todos los días del período menstrual (Figura 13).

La consistencia del sangrado menstrual seguía siendo fluida o semilíquida en 27 pacientes (22,6%) y densa con contenido de secreción mucosa en 53 pacientes (54,1%); fue referida como viscosa con abundante moco cristalino o blanco en el 18,4% de los casos, llegando a ser en el 21,6% de las mujeres incluidas, de consistencia pastosa e incluso seca o grumosa (Figura 14).

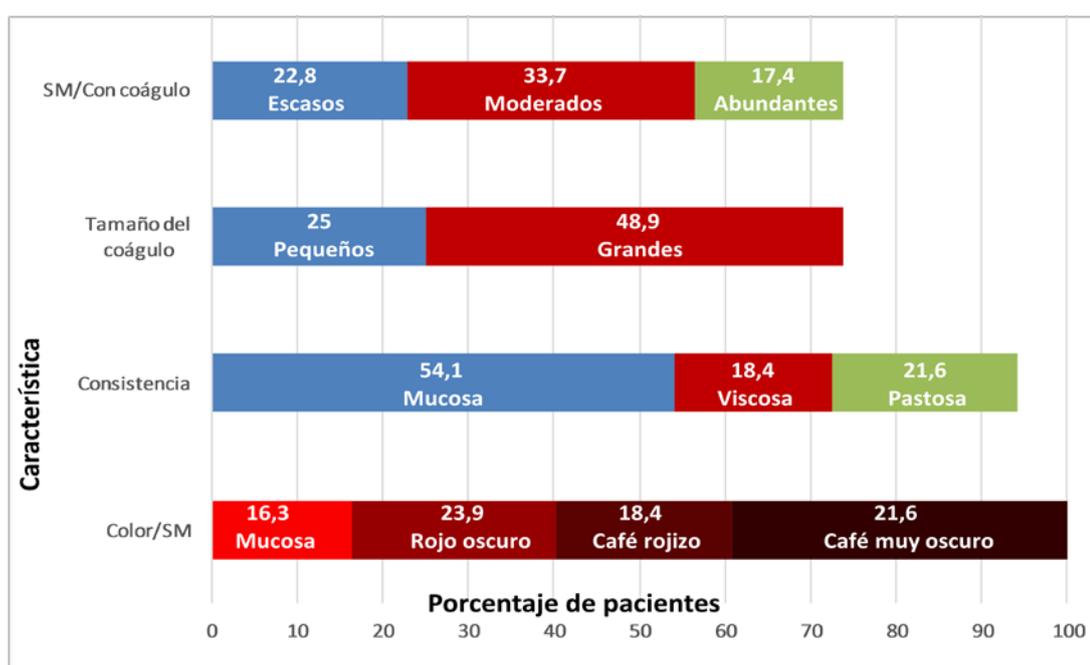


Figura 14. Características del sangrado menstrual: apariencias cualitativas.

La presencia de formaciones densas semisólidas denominadas por las pacientes como “coágulos” fue una observación referida por 72 de las pacientes; la presencia de coágulos grandes en el sangrado menstrual fue mencionada por el 49,5% y en cantidad moderada a abundante (45,9%). Aproximadamente el 23% de las pacientes, los describieron como escasos y pequeños. El 37,5%, de las pacientes asociaron la presencia de coágulos grandes con la presentación de dolor tipo cólico severo, para dos de ellas el cólico menstrual era incapacitante. Además del cólico menstrual, 54 de las pacientes (55,1%), refirieron durante la menstruación y desde unos días antes, distensión abdominal leve (14,3%), moderada (25,5%) o severa (15,3%). La presencia de molestias vaginales durante el sangrado menstrual fue parte de la sintomatología referida por las pacientes en este estudio. El sangrado menstrual provocaba ardor vaginal en 45 mujeres: de grado leve (10,2%), moderado (21,4%) o intenso (14,3%); en 42 casos se presentó prurito vaginal leve (10,2%), moderado (20,1%) o intenso (12,2%). El mismo número de pacientes refería eritema o irritación vulvovaginal durante la menstruación, en grado leve (17,3%), moderado (16,3%) o severo (12,2%).

Otro cambio de fácil observación fue la aparición de una descarga vaginal de color café claro a oscuro, fluida o mucosa, de unas horas a varios días de duración que, a excepción de las pacientes previamente hysterectomizadas, era observado por la mayoría de las pacientes de este estudio. La presentación de este tipo de secreción en los días previos o posteriores a la menstruación estuvo presente en el 63,3% de las pacientes y la descarga café durante la menstruación fue observada en 24,5% de ellas. Además el 47,4% referían una mucosidad café de densidad variable, presente en el período periovulatorio. El 11,2% describieron sangrado intermenstrual periovulatorio como parte de los síntomas presentes y 26,8% mencionaron tener ciclos menstruales irregulares. La Figura 15 presenta algunas de éstas observaciones.

Aunque no es uno de los objetivos de esta tesis, se observó en controles sucesivos como parte del seguimiento del padecimiento, que el aspecto físico del sangrado menstrual, cambió en color a rojo claro brillante, consistencia fluida, volumen y duración; en forma aún más notoria y consistente, la descarga transvaginal café clara, marrón o café oscura de presentación perimenstrual o periovulatoria, desapareció por completo como parte de la manifestación de la IGU, después del tratamiento antibiótico. Estas observaciones

confirmaron la asociación entre las características del sangrado menstrual que las pacientes describieron a su llegada a la consulta ya fuera por subfertilidad o IGU.

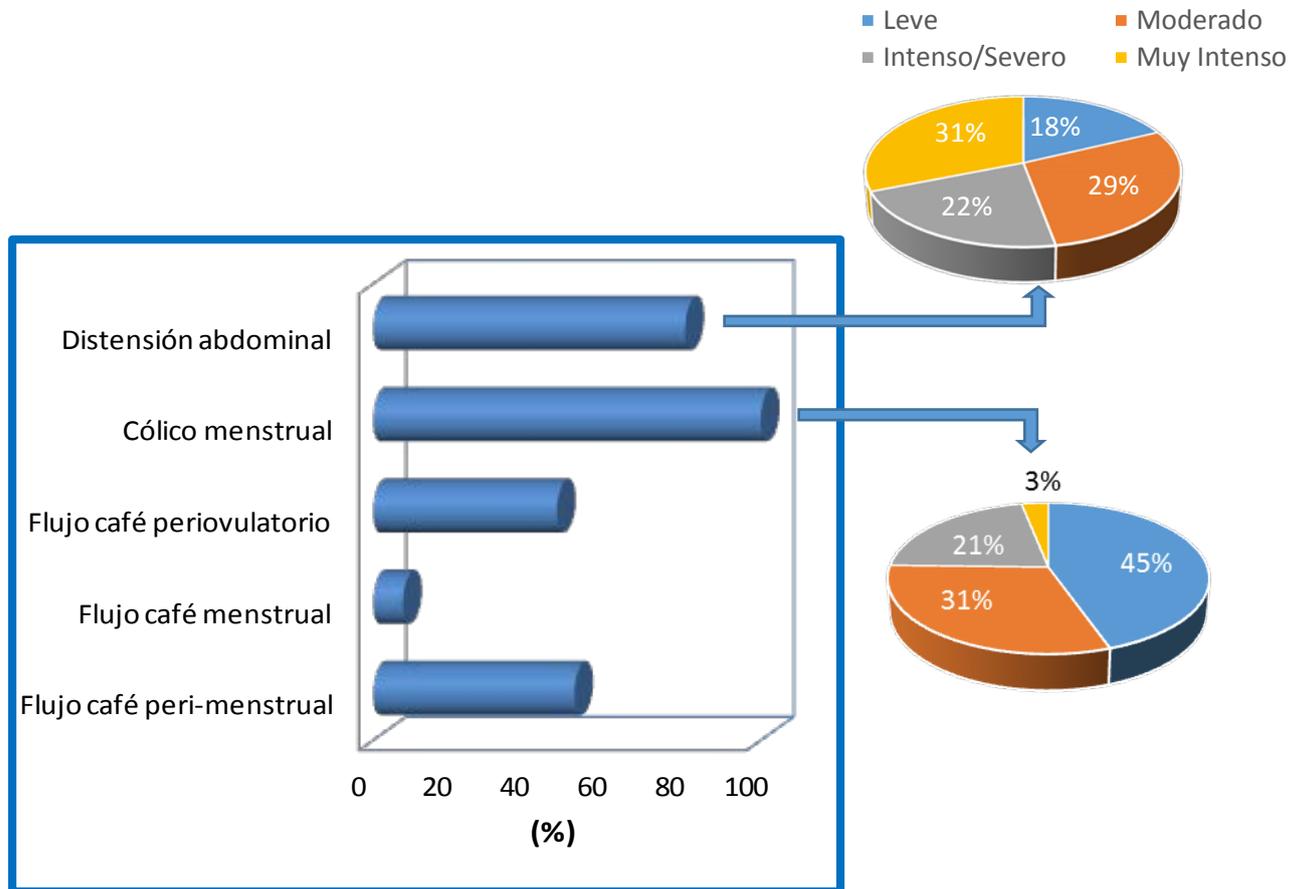


Figura 15. Características del sangrado menstrual: síntomas y signos asociados.

En 63 pacientes (68,5%) la superficie externa del cuello uterino era anormal, presentando eritema leve en 18 casos (19,6%) y moderado a severo en 24 casos (26,1%); también se observó erosión de la superficie epitelial leve (15 casos), moderada (9 casos) o severa (un caso); ulceración en 24 pacientes (26,4%) y en 13 (14,1%) la superficie externa del cuello uterino presentaba sangrado espontáneo. Otros 13 casos presentaron abscesos únicos o múltiples con diámetro variable y 11 tenían lesiones quísticas, denominadas habitualmente como Quistes de Naboth. En 9 casos (17,3%) se observaron pequeños crecimientos granulares o papilares de 1 o 2 mm de diámetro que se consideraron sugestivos de infección por VPH (Tabla VI y Figuras 16 y 19).

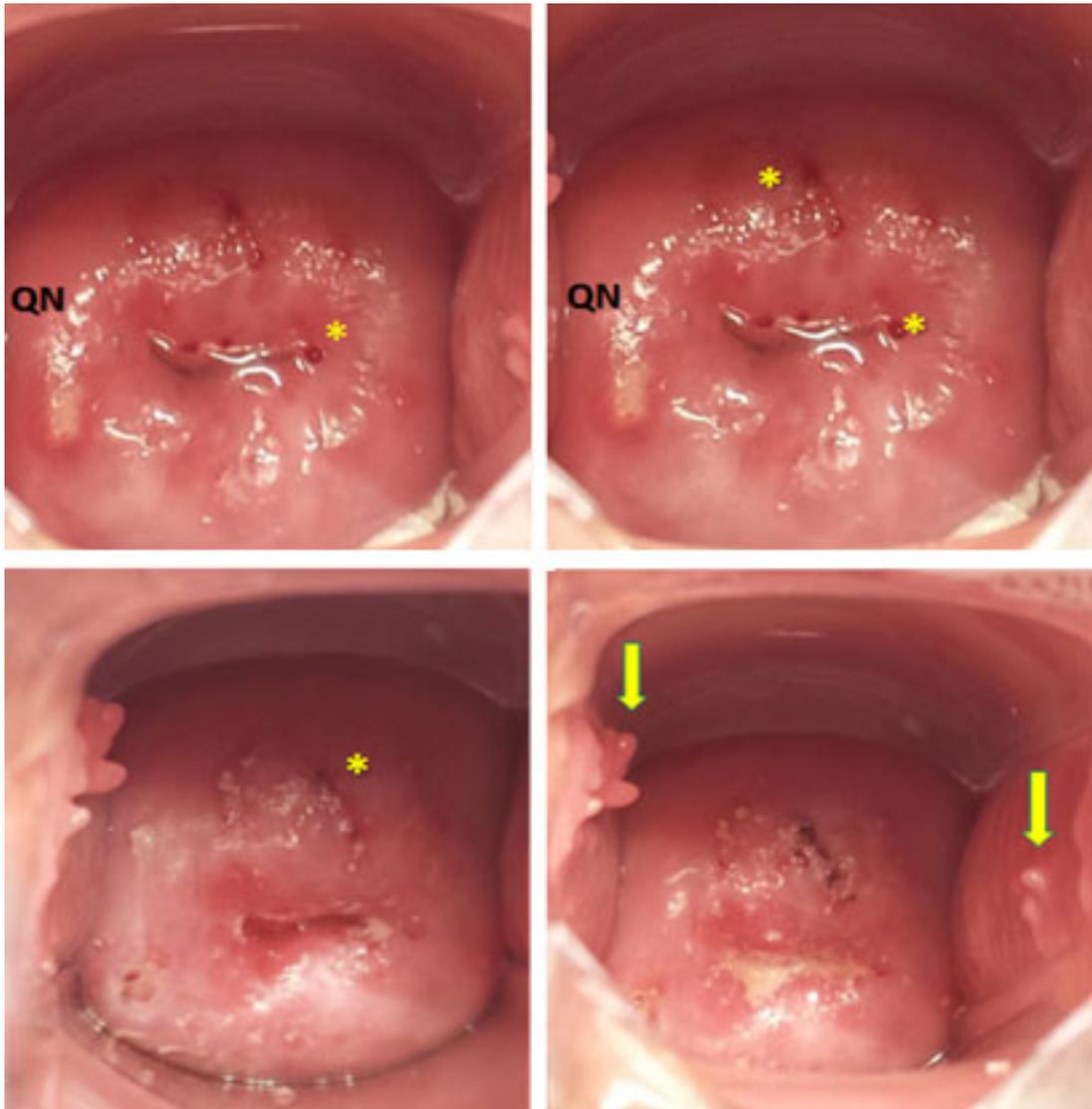


Figura 16. Cervicitis crónica hipertrófica con erosión superficial. Se observan pápulas, de 2 a 3 mm de diámetro múltiples eritematosas (*) y Quiste de Naboth (QN). En las paredes vaginales se observan crecimientos papilares (fechas). La paciente de 34 años, con diagnóstico inicial de IGU por *C. trachomatis* y *U. urealyticum* en ambos cónyuges, resultó positiva en la prueba de VPH (genotipos 16 y 18). El motivo de su consulta fue infertilidad primaria con antecedente de 8 IUI fallidas de causa no explicada.

Mediante la exploración vaginal, se detectó posición excéntrica del cuello uterino con lateralización extrema o retroversoflexión del cuerpo uterino, confirmadas posteriormente mediante estudio ecográfico, en 29 casos de la serie de pacientes estudiadas y se encontró hipertrofia cervical en 56 casos (63,6%), que se calificó como de grado moderado a severo en 47 de ellos (53,4%). El diámetro del orificio del cuello uterino se encontró severamente disminuido en 26 pacientes (28,3%) y, en cambio, era muy amplio y permanecía

prácticamente abierto en 11 casos (12%). En este sitio se observó con una frecuencia de 44,5%, la presencia de una cantidad moderada a abundante de moco denso viscoso que permanecía adherido al tejido de revestimiento epitelial del órgano y que al retirarlo dejaba ver el borde o anillo externo del conducto cervical eritematoso o con tejido de granulación creciendo desde el interior del conducto (ectropión).

Tabla VI. Datos de la exploración del cérvix.

	Toda la Serie		VPH Positivo		VPH Negativo		P
	N	%	N	%	N	%	
Distopia Leve	21	21,9	10	21,3	11	22,4	0,89
Distopia moderada	7	7,3	3	6,4	4	8,2	0,89
Distopia severa	1	1,0	1	2,1	0	0,0	0,89
Hipertrofia Leve	9	9,6	5	10,4	4	8,7	0,78
Hipertrofia moderada	24	25,5	13	27,1	11	23,9	0,78
Hipertrofia severa	23	24,5	10	20,8	13	28,3	0,78
Superficie externa:							
Anormal	63	64,3	30	61,2	33	67,3	0,44
Con eritema leve	18	19,6	8	17,0	10	22,2	0,84
Con eritema moderado	21	22,8	10	23,3	11	24,4	0,84
Con eritema severo	3	3,3	2	4,3	1	2,2	0,84
Con erosión leve	15	16,3	6	12,8	9	20,0	0,33
Con erosión moderada	9	9,8	3	6,4	6	13,3	0,33
Con erosión severa	1	1,1	1	2,1	0	0,0	0,33
Con ulceración leve	21	23,1	21	23,1	123	26,3	0,2
Con ulceración moderada	2	2,2	2	2,2	2	4,4	0,2
Con ulceración severa	1	1,1	1	1,1	1	2,2	0,2
Con sangrado leve	7	7,6	1	2,1	6	13,3	0,06
Con sangrado moderado	6	6,5	2	4,3	4	8,9	0,06
Con abscesos	5	5,4	2	4,3	5	11,1	0,28
Con quistes	11	11,9	5	10,7	6	15,3	0,63

Con mayor frecuencia esta secreción endocervical era blanca, 39 casos (42,4%) o amarillenta en 27 casos (21,3%), cristalina y opaca en 24 casos (26,1%), café en 11 casos (12%) y verde amarillenta en 5 casos (5,4%). El conducto cervical se encontró ocluido en

todo su trayecto en 15 casos (16,3%) sin permitir el paso del hisopo uretral cuyo diámetro es de 2 mm. La estenosis y obstrucción parcial del canal cervical, observada en 37 casos (40,2%) se acompañó regularmente de sangrado al realizar el cepillado endocervical para la exfoliación epitelial, necesaria para la prueba de *Chlamydia trachomatis*.

En 73 casos se extrajo mucosidad contenida en el conducto cervical; en el 43,5% se trató de una cantidad moderada a abundante de mucosidad, con mayor frecuencia de consistencia viscosa, (47,8%) o espesa, (26,1%). En menor proporción, 17,4%, ésta secreción era fluida (Tablas VI y VII y Figuras 17 y 18).

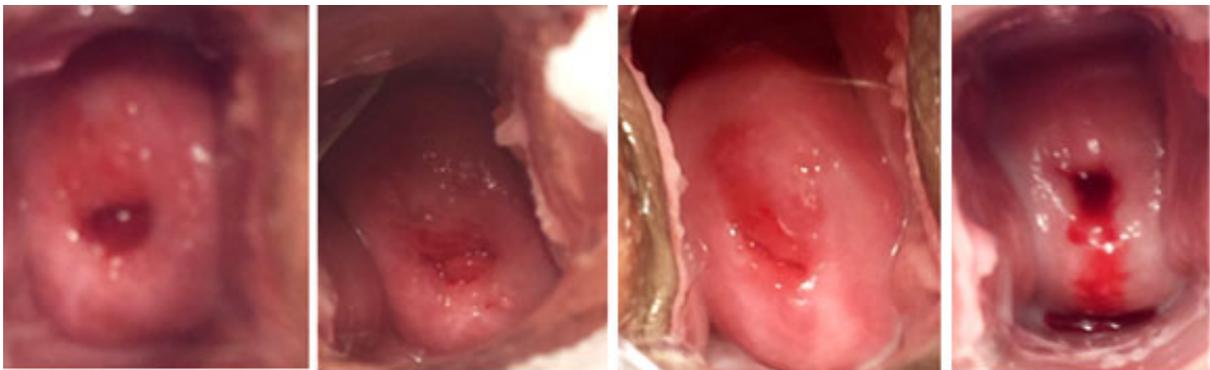


Figura 17. Cervicitis crónica. De izquierda a derecha se observan: un pólipo en el OECU, observado en una paciente con infertilidad primaria; tejido de granulación en el OECU, erosión de la SECU y sangrado del conducto cervical en las pacientes con IGU crónica, pérdidas gestacionales y fracaso en tratamientos de reproducción asistida.



Figura 18. Leucorrea: secreción vaginal blanca amarillenta, mucosa abundante referida en el interrogatorio clínico y presente en la exploración vaginal en un alto porcentaje de las pacientes de éste estudio. En la imagen de la izquierda se aprecia la procedencia de la mucosidad desde el conducto cervical. En la imagen de la derecha la secreción es cristalina y la superficie externa del cuello uterino presenta inflamación.

Tabla VII. Datos del orificio externo y canal cervical.

	Toda la Serie		VPH Positivo		VPH Negativo		P
	N	%	N	%	N	%	
Orificio externo:							
Normal	55	59,8	31	68,9	24	51,1	0,21
Muy abierto	11	12,0	4	8,9	7	14,9	0,21
Ocluido	26	28,3	10	22,2	16	34,0	0,21
Con secreción:							
Escasa	28	30,4	16	34,0	12	26,7	0,90
Moderada	21	22,8	10	21,3	11	24,4	0,90
Abundante	20	21,7	10	21,3	10	22,2	0,90
Cristalina	13	28,9	11	23,4	13	28,9	0,55
Verde amarillenta	5	5,4	3	6,4	2	4,4	0,68
Blanca amarillenta	27	21,3	10	21,3	17	37,8	0,8
Blanca	39	42,4	22	46,8	17	37,8	0,38
Café	7	14,9	7	14,9	4	8,9	0,37
Canal cervical:							
Normal	40	43,5	21	46,7	19	40,4	0,73
Obstruido parcialmente	37	40,2	18	40,0	19	40,4	0,73
Obstruido por completo	15	16,3	6	13,3	9	19,1	0,73
Con secreción:							
escasa	33	35,9	15	32,6	18	39,1	0,83
Moderada	24	26,1	14	30,4	10	21,7	0,83
Abundante	16	17,4	8	17,4	8	17,4	0,83
De consistencia:							
Líquida	16	17,4	6	13,0	10	21,7	0,41
Espesa	24	26,1	13	28,3	11	23,9	0,41
Viscosa	44	47,8	22	48,9	22	46,8	0,84

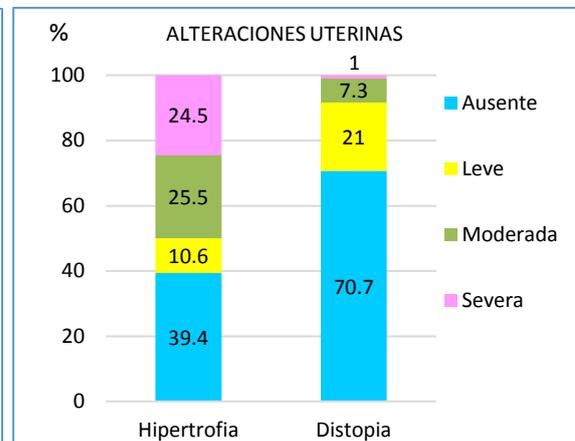
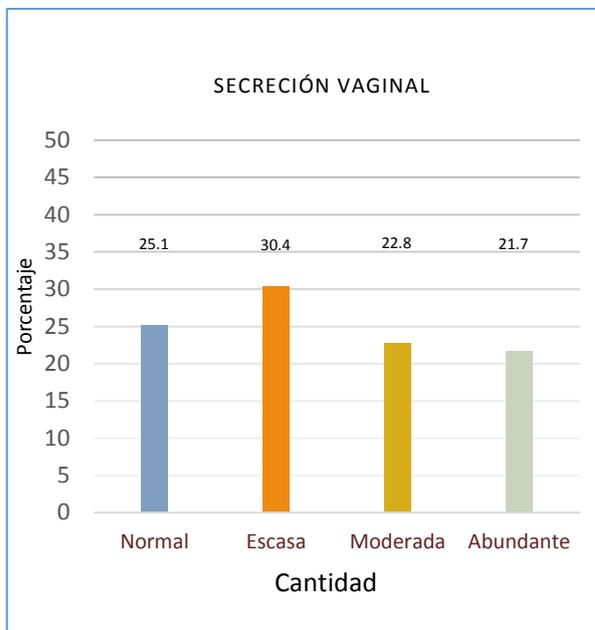
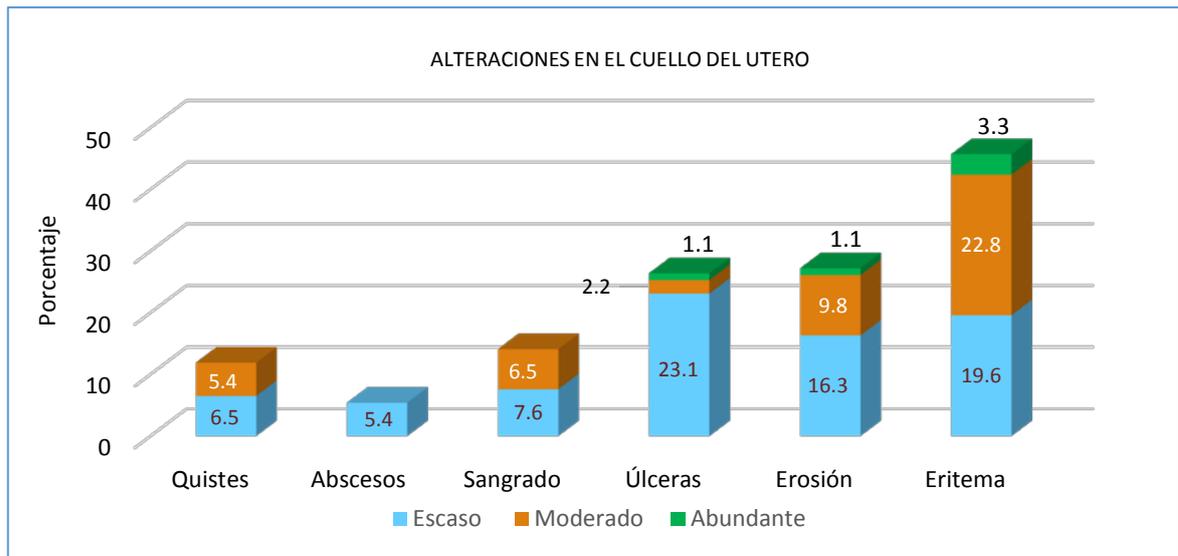


Figura 19. Exploración vaginal: características del cuello uterino.

En lo referente a la cavidad vaginal, la exploración realizada detectó: eritema en el 44,2%, erosión leve del fondo de saco vaginal en 5 casos, con sangrado ligero en 2 de ellos. Las paredes vaginales se vieron inflamadas en el 28,8% de las pacientes la tabla VIII resume los datos de estas observaciones.

Tabla VIII. Datos de la exploración física vaginal.

	Toda la Serie		VPH Positivo		VPH Negativo		P
	N	%	N	%	N	%	
Cúpula vaginal:							
Con dolor	65	64,4	33	67,3	32	61,5	0,76
Con inflamación	53	52,5	26	53,1	27	51,9	1,0
Con sanrado	17	19,1	9	19,1	8	15,4	0,88
Con secreción:							
Escasa	52	51,5	25	51,0	27	51,9	0,83
Moderada	29	28,7	15	30,6	14	26,9	0,83
Abundante	17	16,8	17	16,8	10	19,2	0,83
Cristalina	26	25,7	16	32,7	10	19,2	0,12
Blanca	78	85,7	42	85,7	36	69,2	0,05
Amarilla	60	59,4	27	55,1	33	63,7	0,42
Verde	5	5,0	2	4,1	3	5,8	1,0
Café	25	25,0	11	22,9	14	26,9	0,64
Pared vaginal:							
Con eritema	45	45,5	22	46,8	23	44,2	0,80
Con erosión	4	4,0	1	2,1	3	5,8	0,62
Con sangrado	5	5,1	3	6,4	2	3,8	0,66
Con inflamación	30	30,3	15	31,9	15	28,8	0,91

En 19 casos (26,1%), se encontraron lesiones papilomatosas múltiples, que se muestran en las imágenes de la Figura 20. En una menor proporción de pacientes se observaron lesiones papilares o verrugosas únicas (5,7%). Se identificaron formaciones papilares en diversa cantidad, forma y tamaño en el introito vaginal de 4 de las pacientes, en 3 casos se observaron en los labios menores de la vulva, 2 pacientes presentaban estas lesiones en los labios mayores de la vulva, uno de los casos presentaba las lesiones papilomatosas múltiples en la región perineal y otro caso más en los pliegues anales. La Tabla IX resume los resultados numéricos de las observaciones hechas en las pacientes con respecto a lesiones presentes que sugerían presencia de VPH.

Tabla IX. Presencia de lesiones papilomatosas.

Localización	Toda la Serie		VPH Positivo		VPH Negativo		P
	N	%	N	%	N	%	
En paredes vaginales:							
Únicas	12	11,9	9	18,8	3	5,7	0,11
Múltiples	36	35,6	17	35,4	19	35,8	0,78
En la superficie externa del cuello uterino	14	14,0	6	12,5	8	15,4	0,78
En el introito vaginal	7	6,9	3	6,2	4	7,5	1,0
En labios menores de la vulva	6	5,9	3	6,2	3	5,7	1,0
En labios mayores de la vulva	4	4,0	2	4,2	2	3,8	1,0
En región perineal	4	4,0	3	6,2	1	1,9	0,34
En pliegues anales	1	1,0	0	0,0	1	1,9	1,0

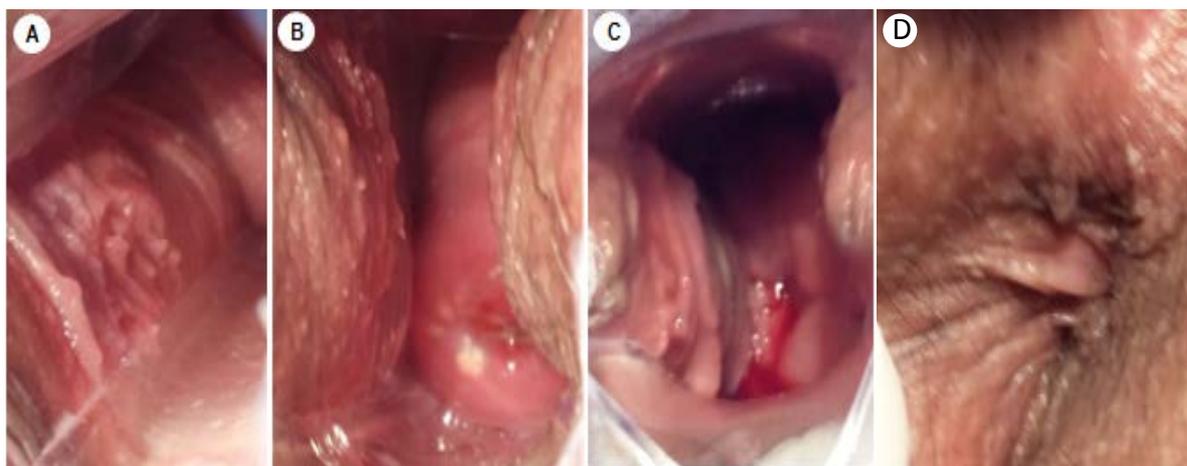


Figura 20. Formaciones papilares múltiples observadas en el 35,6% de las pacientes de este estudio. (A) En la pared vaginal; (B) Cérvix uterino hipertrófico inflamado y (C) sangrado del conducto cervical; (D) papilomas o verrugas perianales.

4.4 RESULTADOS DEL GENOTIPADO DEL VPH

4.4.1 Distribución de Diferentes Genotipos de VPH en las Pacientes

Como parte de la atención necesaria en este grupo de pacientes se decidió investigar la presencia del VPH, ya fuera por la observación de lesiones cervicales, vaginales, vulvares o perianales, por observación de coilocitos en los estudios citológicos en fresco, realizados

para el monitoreo del tratamiento de las infecciones, o por persistencia o reincidencia de síntomas vaginales o urinarios a pesar del tratamiento llevado a cabo y de la disminución de la carga bacteriana en las secreciones analizadas. Los resultados de las pruebas realizadas en la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León se presentan en la Tabla X. Como se describió al inicio de este capítulo, la identificación de ADN del VPH fue detectada por la prueba de PCR en 51 de las mujeres correspondiente al 49% [IC. 95%; 39,4-58.6] en las que se realizó este estudio. En el resto de las pacientes (53 casos equivalente al 51%) no se pudo demostrar la presencia de los genotipos de VPH investigados, mediante las técnicas empleadas (Figura 21).

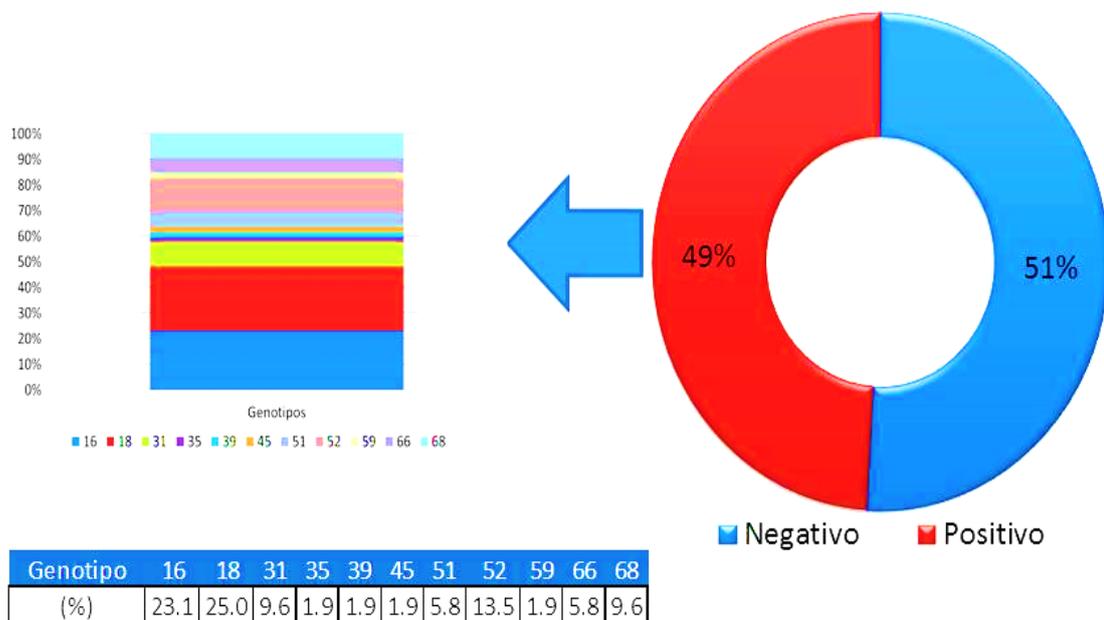


Figura 21. Pacientes con al menos un genotipo de VPH positivo. Las barras representan los VPH de riesgo alto.

Los genotipos de mayor prevalencia fueron: el VPH 6 (19,2%), VPH 18, (12,5%), VPH 16 (11,5%), VPH 58 (7,2%), VPH 52 (6,7%), VPH 11 (6,7%), VPH 68 (7,5%). Con la misma frecuencia de 4,8%, correspondiente a 4 casos, se encontraron los VPH de alto riesgo 31, 33, y 68. Con menor frecuencia los VPH 51, 66 y 39, también de alto riesgo se identificaron cada uno en muestras de exudado cérvico vaginal de tres pacientes (2,9%). La frecuencia de aparición del VPH 35, 45, 59 y genotipos de riesgo no definido: 71, 55, 61 y 81 fue del 1%. (Figura 22 y Tabla X). De acuerdo a la disponibilidad de las sondas moleculares, algunos

genotipos de VPH adicionales (81, 26, 56, 73, 82, 69,74, 70, 43, 44, 40 y 54) se estudiaron en algunos pacientes. En ninguna de las muestras analizadas se encontraron estas variantes de VPH. Sin embargo, además del VPH las muestras contenían otros gérmenes, como corresponde al caso ilustrado en la figura 23.

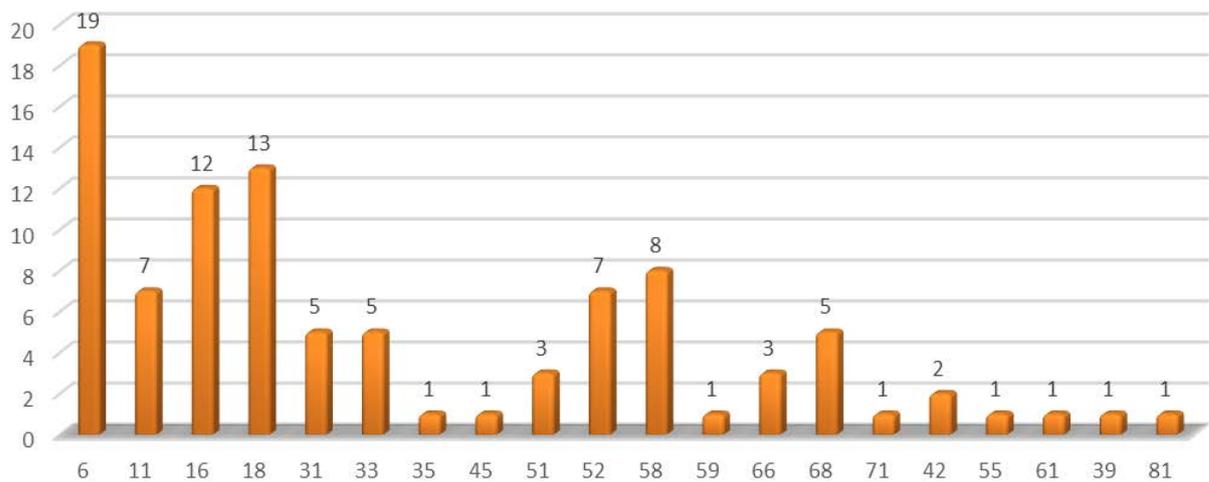


Figura 22. Distribución de genotipos de VPH de alto y bajo riesgo.

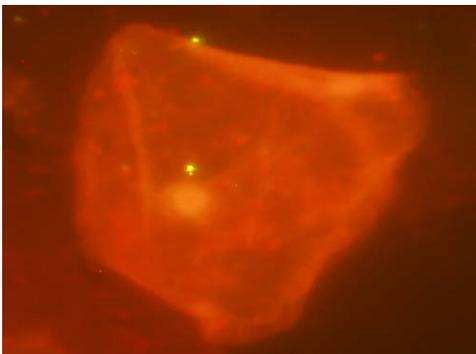


Figura 23a. Cuerpos elementales fluorescentes en una célula del ECV de una paciente con ICP; los cultivos bacterianos fueron negativos.



Figura 23b. Electroforesis en gel de agarosa para detección de *C. Trachomatis*. L: Marcador de PM (100 pb), 1: Control (-), 2: Control (+), 3-11: paciente sin infección, 12: paciente infectada.

Tabla X. Distribución de genotipos del Virus del Papiloma Humano.

	Riesgo	Pacientes		Positivo	
		N	%	N	%
6	bajo	104	100	20	19,2
16	alto	103	99,0	12	11,6
18	alto	104	100	13	12,5
58	alto	72	69,2	8	11,1
52	alto	98	94,2	7	7,1
11	bajo	104	100	7	6,7
31	alto	87	83,7	5	5,7
33	alto	72	69,2	5	6,9
68	alto	67	64,4	5	7,5
66	alto	67	64,4	3	4,5
51	alto	98	94,2	3	3,1
42	bajo	66	63,5	2	3,0
39	alto	69	66,3	3	4,3
59	alto	69	66,3	1	1,4
45	alto	73	69,2	1	1,4
35	alto	73	69,2	1	1,4
71	bajo	70	67,3	1	1,4
61	bajo	69	66,3	1	1,4
55	bajo	63	60,6	1	1,6
81	bajo	1	1,0	1	-

4.4.2 Asociación entre Genotipos de VPH de Alto y Bajo Riesgo

De los casos positivos, 40% presentaron solamente una variante genotípica del VPH y en el 60% las pruebas moleculares identificaron 2 o más genotipos. En este grupo de estudio se observaron 67 diferentes combinaciones de las variantes genotípicas de VPH estudiadas. De ellas 46,3%, (n=31) correspondieron a combinaciones de diversos genotipos de alto riesgo: 4 pacientes fueron positivas a la vez para el VPH 16 y 18 y otras 4 pacientes los fueron para el 16 y 58. Dos pacientes eran portadoras del VPH 16 y 33, otras 2 del 16 y 52 y dos más para los VPH 18 y 52.

Otro número importante de casos, 44,8%, presentaron en el exudado cérvico vaginal combinaciones de VPH que incluían al menos un genotipo de alto riesgo como se describe a continuación: en 8 casos estaban presentes el VPH 6 y el 18; en 4 casos el 52 y el 6; en 3 casos el 16 y el 6; en tres casos el 58 y el 6; en 2 casos el 39 y el 6; en 2 casos el 16 y el 11. Algunos ejemplos de estas asociaciones entre VPH de riesgo alto se ilustran en la Figuras 24 y 25.

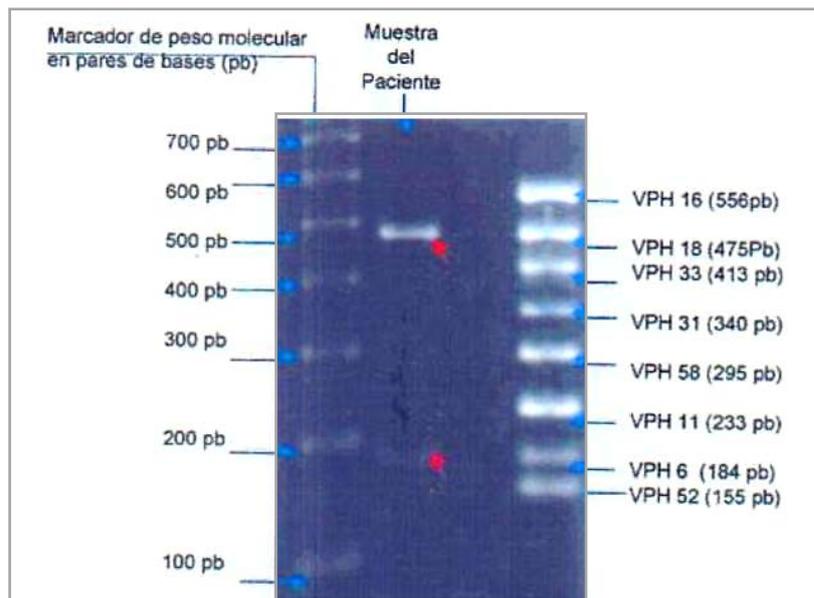


Figura 24. PCR Multiplex. Positivos para la banda VPH 18: banda de 475 pb y VPH 6: banda de 184 pb. La combinación de VPH 6 con VPH de alto riesgo se encontró en 50,9% de las nuestras positivas para VPH en este trabajo.

Considerando la presentación aislada de VPH de bajo riesgo observada en 6 pacientes (20,5%) se estimó que el 79,5% del grupo con VPH tenía al momento de este estudio un riesgo potencial para cáncer cérvico uterino por VPH, por presentar al menos un genotipo de VPH de alto riesgo.

	16	18	26	31	33	35	39	45	51	52	53	56	58	59	66	68	73	82	6	11	40	42	43	44	54	55	61	70	71	81
16																														
18	4																													
26																														
31		1																												
33	2	1		1																										
35																														
39	1	1						1																						
45	1	1																												
51				1																										
52	2	2			1																									
53																														
56																														
58	4		1	1													1													
59																														
66	1																													
68	1	1																												
73																														
82																														
6	3	8		1	1	1	2			4		1	3	1	1															
11	2	1			1															3										
40																														
42																														
43																														
44																														
54																														
55																														
61																														
70																														
71																														
81																														
	16	18	26	31	33	35	39	45	51	52	53	56	58	59	66	68	73	82	6	11	40	42	43	44	54	55	61	70	71	81

Figura 25. Número de casos con al menos dos genotipos de VPH encontrados en las muestras de exudado cérvico vaginal de las pacientes incluidas en este estudio.

4.4.3 Coinfección por VPH y Bacterias en la IGU

La presencia de VPH se dio en asociación con *Chlamydia trachomatis* aunque no de forma significativa. Del total de 90 muestras que fueron positivas a la reacción de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales contra *C. trachomatis*, en 46 casos se encontró VPH (51,1%). Esos mismos 46 casos representaron el 90,2% dentro del grupo VPH positivo (n=49). En el resto de los 44 exudados cérvico vaginales (51,1%), la

prueba de PCR para VPH arrojó un resultado negativo. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,39$).

En 29 del total de 49 cultivos de ECV a partir de los que se logró aislar e identificar *Ureaplasma urealyticum* se aisló también ADN del VPH. Esa cifra dentro del grupo VPH positivo representó el 56,9% mientras que los 20 casos restantes con *Ureaplasma urealyticum* formaron parte del grupo VPH negativo (37,7%). Es así que la presencia de *U. urealyticum*, se correlacionó con el VPH de forma estadísticamente significativa ($p=0,05$).

En los 37 casos con *Mycoplasma hominis* el 43,2% la prueba de VPH resultó positiva. Dieciséis de ellos constituyeron el 31,4% del grupo VPH positivo y el resto correspondió al 37,7% del grupo VPH negativo, siendo esa diferencia no significativa ($p=0,38$).

De los casos en que mediante el cultivo general se aisló *E. coli* (21 de la serie completa), 13 (25,5%) pertenecieron al grupo VPH positivo y 8 (15,1%) al grupo VPH negativo ($p=0,22$). Para los 18 casos en que se encontró *C. albicans* (17,3% del grupo completo de pacientes) la proporción dentro del grupo VPH positivo y VPH negativo fue la misma. De igual forma no hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar el porcentaje de presencia de *E. faecalis* (11 casos), *P. aeruginosa* (3 pacientes), *Citrobacter freundii* (dos pacientes) y *P. Mirabilis* (una paciente) en los grupos VPH positivo y VPH negativo.

En cambio la comparación entre el grupo de pacientes positivos para VPH y negativos definió el estado de la microbiota vaginal en relación negativa con la presencia del VPH. En casi el 80% de las 104 pacientes estudiadas, la microbiota vaginal era nula o estaba disminuida: en el 47,1% del grupo VPH positivo estaba ausente y en el 33,3% estaba disminuida. Para esta diferencia, estadísticamente significativa, el valor de P fue de 0,03. (Tabla XI).

Tabla XI. Presencia de otros gérmenes y asociación al VPH en pacientes infértiles.

	Toda la Serie		VPH Positivo		VPH Negativo		P
	N	%	N	%	N	%	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	90	86,5	46	90,2	44	83,0	0,39
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	49	47,1	29	56,9	20	37,7	0,05
<i>Mycoplasma hominis</i>	37	35,6	16	31,4	21	31,6	0,38
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	10,6	8	15,7	3	5,7	0,09
<i>Escherichia coli</i>	21	20,2	13	25,5	8	15,1	0,22
<i>Candida albicans</i>	18	17,3	9	17,6	9	17,0	1,0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	3	2,9	1	2,0	2	3,8	1,0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,0	0	0,0	1	1,9	1,0
<i>Citrobacter freundii</i>	2	1,9	2	3,9	0	0,0	0,24
Microbiota							
Nula	55	52,9	24	47,1	31	58,5	0,03
Escasa	25	24,0	17	33,3	8	15,1	0,03
Moderada	11	10,6	7	13,7	4	7,5	0,03
Abundante	13	12,5	3	5,9	10	18,9	0,03

4.4.4 Infección por VPH y Datos Clínicos Asociados

Para cada uno de los parámetros clínicos recabados del expediente clínico y antecedentes descritos en la primera parte de este capítulo se hizo un análisis comparativo de sus frecuencias, entre el grupo con diagnóstico positivo de VPH y el grupo de pacientes para el que el resultado de la prueba de VPH resultó negativo.

Los resultados de la comparación de las variables consideradas para este estudio, contra el resultado positivo o negativo para la prueba de VPH (Tablas I a XI). Como se puede observar, para la mayoría de las variables clínicas analizadas, ya fuera de signos, síntomas o datos provenientes de la exploración física, no hubo una diferencia estadística en la frecuencia de presentación, entre los grupos VPH positivo y VPH negativo. Las diferencias observadas entre grupos VPH positivo y VPH negativo fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) para la presencia de signos y síntomas de infección genitourinaria activa en el momento de realizar el muestreo de las secreciones cérvico-vaginales analizadas ($p=0,01$),

Tabla II; para el antecedente de dos o más parejas sexuales previas ($p=0,05$), Tabla II; para el antecedente de diagnóstico de infección por VPH, ($p=0,0001$) (Tabla III); para el diagnóstico de una o más citologías que describía la presencia de proceso inflamatorio leve o moderado de tipo inespecífico ($p=0,05$), Tabla III y para la presencia de secreción mucoide densa de color blanco en el fondo de saco vaginal ($p=0,05$). (Tabla VIII).

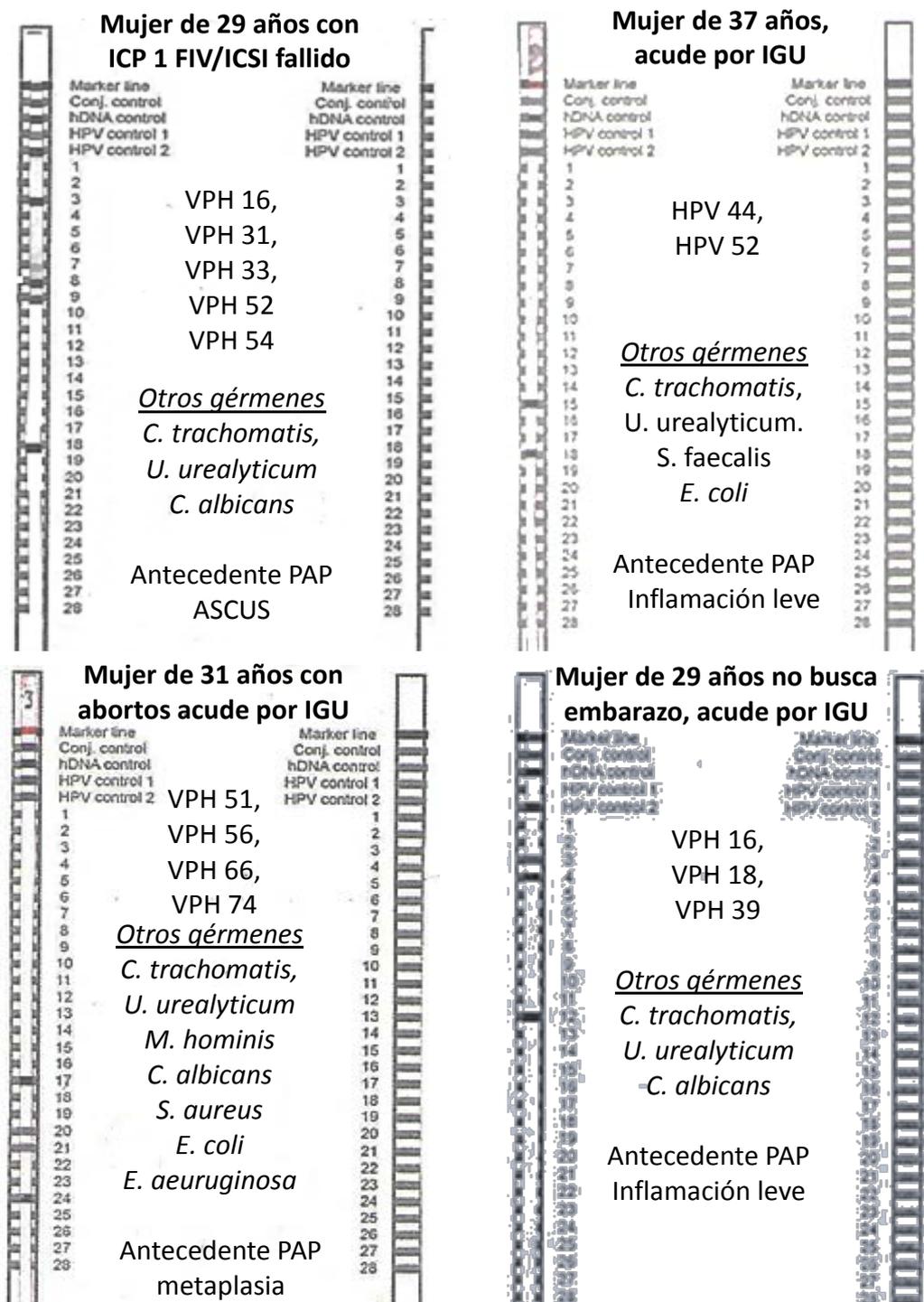


Figura 26. Ejemplos de los resultados de pacientes de este estudio con infecciones multimicrobianas.

4.4.5 Asociación entre la IGU, el VPH y la Pérdida Gestacional

Aunque el análisis estadístico de las variables estudiadas, no establece una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del VPH, de las 28 pacientes que refirieron el antecedente de aborto, el 50% de ellas fueron positivas para el VPH 11; el 17,8% para el VPH 68; el 14,2% para el VPH 52 y el mismo porcentaje, 10,7%, para los VPH 31, 16 y 18.

Dos pacientes con antecedente de aborto fueron positivas para 3 diferentes genotipos de VPH. En una de ellas se trató de los VPH 61, 81 y 66 y en la otra paciente se encontraron los VPH 6,11, y 58.

De las 10 pacientes con mayor número de pérdidas gestacionales (3 o 4 abortos consecutivos), 6 fueron positivas para VPH. En ese grupo de pacientes se aislaron los VPH 6, 61, y 71 de bajo riesgo y 51, 52, 66, 16, 18, 68 de alto riesgo. De los 4 casos negativos para VPH de éste grupo de pacientes en dos se aplicó la PCR Multiplex que detecta solo 7 u 8 virus; en una de ellas, el cónyuge se realizó la prueba de PCR y resultó portador de los VPH 6 y 18.

Pacientes con dos abortos tenían los VPH 6, 18 y pacientes con un solo aborto fueron positivas para los VPH 6 y 11 de bajo riesgo y para los VPH 16, 18, 58, 68 51 de alto riesgo y para el VPH 71 del que aún no se reconoce su riesgo carcinogénico.

En este mismo grupo se identificaron 4 casos de exudado cérvico vaginal sin evidencia molecular de VPH, pero las parejas de esas mujeres eran portadores de los VPH 6 11, 16, 18, 31, 35 y 52.

Diez de las 28 pacientes con pérdida gestacional temprana, en la que no se pudo demostrar la presencia de VPH en el exudado cérvico vaginal y en las que no se contó con prueba de VPH en el cónyuge, tenían pruebas microbiológicas de exudados cérvico vaginales, que demostraban la presencia de *C. trachomatis*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, *E. coli* y/o *C. albicans*.

Tabla XII. Asociación entre el VPH y el aborto.

Nº de Caso	Nº Abortos	Genotipos Estudiados	Genotipo Presente en la Paciente	Genotipos en el Cónyuge
1	4	20	6, 52	
2	3	20	61, 66, 81	
3	3	20	16	18
4	3	6	6	45
5	3	8	6	
6	3	18	18, 68	
7	3	7	Negativo	6, 18
8	3	20	Negativo	
9	3	8	Negativo	
10	3	20	Negativo	
11	2	8	6, 18	6
12	2	8	Negativo	6
13	2	6	Negativo	
14	2	20	Negativo	
15	2	17	Negativo	
16	2	20	Negativo	
17	1	20	6, 11, 18	
18	1	20	16, 58	
19	1	20	68, 71	
20	1	20	51	
21	1	6	Negativo	18, 51
22	1	8	Negativo	
23	1	20	Negativo	
24	1	20	Negativo	
25	1	20	Negativo	
26	1	20	Negativo	

4.4.6 Asociación entre la IGU, el VPH y Tratamientos de Reproducción Asistida

Se pudo observar, que de las 53 pacientes tratadas por diversas técnicas de reproducción asistida el 58,49% fueron positivas en la prueba de PCR para VPH. Los genotipos detectados fueron el 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 55, 58, 59, 66, 68 y 71;

siendo los genotipos más diagnosticados el VPH 6 (21,87%) y con las misma frecuencia, los VPH 11 y 18 (12,5%). La prevalencia fue de 6,25% para los VPH 16, 31, 52 y 58.

La tasa de éxito, definida como embarazo a término, de todos los procedimientos de reproducción asistida fue del 0%. Sólo en tres casos la prueba de embarazo posterior al procedimiento fue positiva, pero en ninguno de ellos el embarazo prosiguió más allá de la cuarta semana.

Como se mencionó antes, considerando globalmente a la inseminación intrauterina y la fertilización *in vitro* en combinación con la inyección intracitoplásmica de espermatozoides, en este estudio no se logró establecer una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del VPH y el resultado de los procedimientos de reproducción asistida ($p=0,48$). Sin embargo como puede apreciarse en los datos presentados en la Tabla IV, el análisis estadístico de los 15 casos con FIV/ICSI determinó una mayor frecuencia de estos procedimientos referidos como antecedente por las pacientes en los casos donde la prueba de VPH fue positiva ($p=0,002$).

Ninguna de las ocho pacientes (22,22% del grupo con tratamientos previos de FIV), lograron un embarazo; entre ellas, 87,5% fueron positivas para VPH: 26,6% para el VPH 6; el 20% para el VPH 11; el 13,3% para el VPH 18 y el mismo porcentaje de 6,6% para los genotipos 16, 31, 35, 52, 58 y 66. Una de estas pacientes recibió 2 veces el tratamiento sin obtener éxito, resultando ulteriormente positiva para VPH 6 y 11, que a su vez fueron los genotipos más prevalentes en este grupo de estudio.

El 19,44% (7 casos) de las pacientes habían sido tratadas con técnicas de reproducción asistida; de éstas 4 (57,14%) eran positivas para VPH: el 30% para el VPH 6; el 20% para el VPH 18; y el mismo porcentaje, de 10%, para los genotipos 11, 31, 35, 52 y 58.

Dentro del subgrupo de estudio, con tratamiento previo de reproducción asistida, la prueba de embarazo fue positiva después del procedimiento en una sola paciente, aunque sobrevino un aborto antes de la octava semana, destacando en ese caso que tanto en la paciente como en su cónyuge la determinación de VPH por PCR fue positiva (genotipos 52 y 58).

Todas las pacientes que habían sido tratadas con FIV/ICSI habían sido tratadas con inseminación artificial entre 1 y 5 ocasiones. Solo se había conseguido el embarazo en uno de esos procedimientos que correspondía a una paciente con resultado negativo para la presencia del VPH; sin embargo el cónyuge era positivo para los serotipos 18 y 51. Dentro de este grupo de estudio, el 47,22% fueron positivas para los genotipos de VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 55, 58, 59, 66, 68 y 71. En la Figura 27 se presentan ejemplos de los resultados de la investigación del VPH en algunos casos de este estudio. Como antes se mencionó el análisis estadístico hecho con el total de las 15 pacientes con antecedente de tratamientos de FIV e ICSI que regularmente son procedimientos combinados, asoció positivamente su falta de éxito a la presencia del VPH.

Tabla XIII. Asociación entre VPH y el resultado de la reproducción asistida.

TRA	Pacientes Tratadas		Mujeres VPH (+) %	Cónyuge VPH (+) %	VPH (+) en Ambos %	% de Éxito	VPH de Mayor Prevalencia %	
	N	%					6	18
IIU	38	100	47,22	5,55	16,66	2,7	6 11 18	21,87 12,5 12,5
FIV	8	22,22	87,50		25,0	0	6 11 18	26,6 20,0 13,3
ICSI	7	19,44	57,19		28,57	14,28	6 18	30,0 20,0

TRA: Tratamiento de Reproducción Asistida; IIU: Inseminación Intrauterina; FIV: Fertilización In Vitro; ICSI: Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides.

Solamente en 47 de las pacientes pudo ser evaluada la pareja para investigar la presencia de VPH en secreciones genitales, líquido seminal y exfoliado uretral. En 17 casos (41,46%) se detectó ADN del VPH y en 7 de ellos se identificaron de 3 a 6 variantes genotípicas del virus.

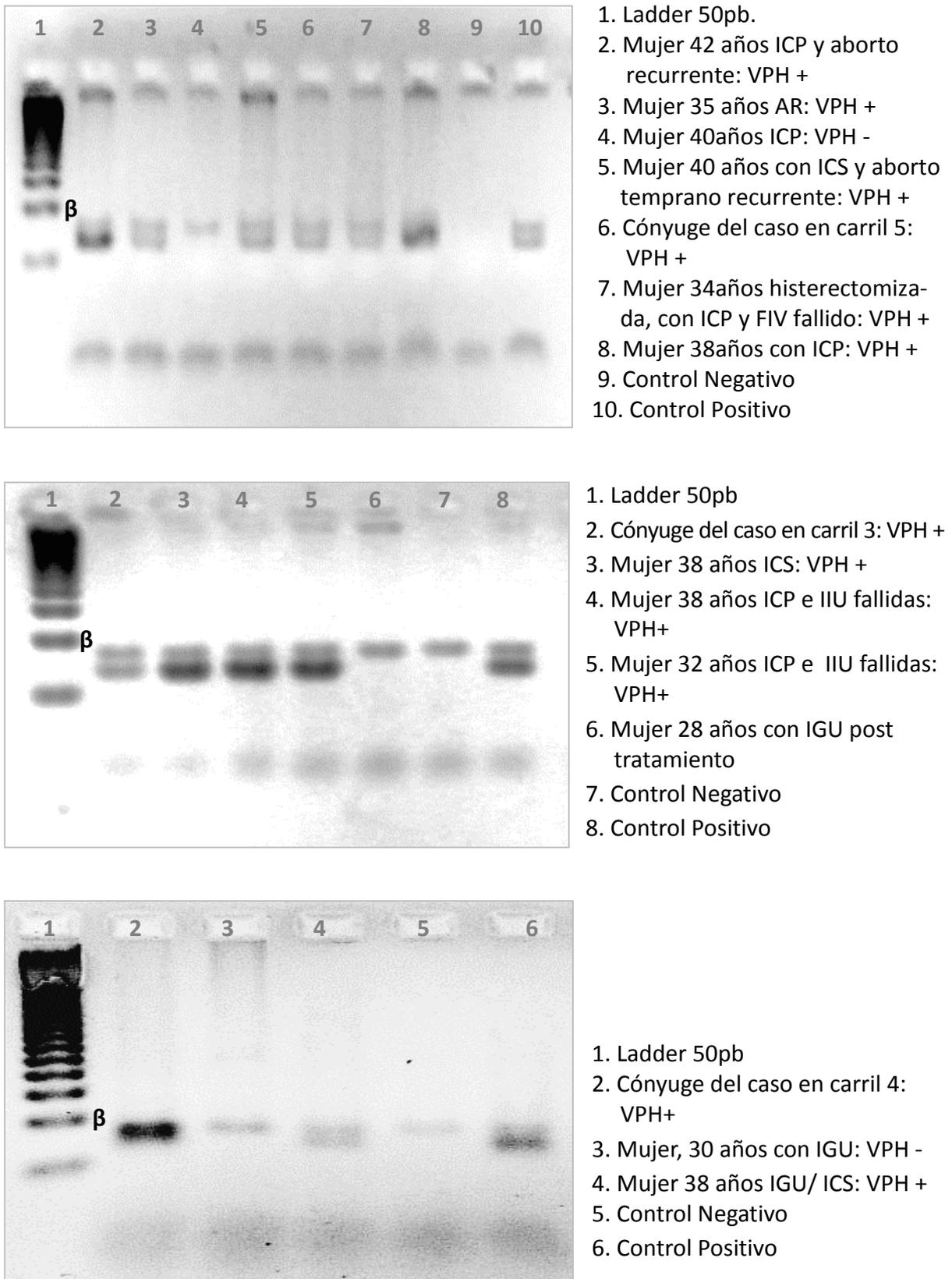


Figura 27. Identificación del ADN de VPH por PCR en muestras del exudado cérvico vaginal de algunas de las pacientes de este estudio. Se indica el control de peso molecular de β -globina (β).

5. DISCUSIÓN

El diagnóstico y tratamiento de las infecciones genitourinarias es esencial en la evaluación y manejo inicial de parejas que sufren de infertilidad. Sin embargo, una gran proporción de los hombres con infecciones genitourinarias no presentan sintomatología, no aparecen alteraciones mayores en el seminograma, pero el líquido seminal y los espermatozoides son portadores de gérmenes que se asientan posteriormente en el útero de la pareja. Las infecciones uterinas alteran el microambiente óptimo para la fecundación e implantación embrionaria y con el tiempo ocasionan lesiones que inhabilitan al órgano para cumplir su función reproductora. En relación con las infecciones que se asocian a la infertilidad, el aborto, el embarazo ectópico, la ruptura prematura de membranas, se encuentran gérmenes que se transmiten por contagio sexual.

En la actualidad se reconoce que las enfermedades de transmisión sexual (ETS) representan un problema de salud importante a nivel mundial. Tratándose de un grupo de padecimientos de origen infeccioso y vinculado al estilo de vida, la prevención es una tarea fundamental, sobre todo cuando se sabe que algunas de ellas tienen una asociación causal con enfermedades graves, como puede ser el desarrollo de neoplasias malignas.

Entre las ETS, las causadas por el Virus del Papiloma Humano han recibido mayor atención desde que hace décadas se comprobó la relación causal directa entre la infección por el VPH y la aparición del cáncer cérvico uterino, son las de mayor prevalencia y su efecto en la etiología del cáncer está bien documentado. Hoy en día se acepta que el cáncer cervical es una enfermedad de transmisión sexual. Estos hechos tienen evidente repercusión en la práctica clínica y obligan a replantear el paradigma por el que se rige la prevención del cáncer cervical (Gillison *et al.*, 2014; Ghittoni *et al.*, 2015).

La mayoría de las infecciones por VPH son asintomáticas y en su evolución natural un número importante de mujeres jóvenes se infecta en las edades de mayor actividad sexual; por fortuna, la mayor parte de estas infecciones (del 90 al 95% de los casos) se resuelve de forma espontánea y sin consecuencias. Sin embargo, se conoce que el VPH persiste después de los 35 o 40 años, en el 5% de las mujeres que se infectaron en la juventud, lo que implica un riesgo mayor para el desarrollo del cáncer cervical (Dunne & Park, 2013; Gillison *et al.*, 2014; Souho *et al.*, 2015).

A este grupo de edad pertenecen un elevado porcentaje de mujeres que buscan atención médica por infertilidad o subfertilidad y antecedentes de pérdida gestacional, recurrente y tratamientos de reproducción asistida que no han tenido éxito. Por lo que consideramos importante conocer la presencia de VPH en pacientes que no tienen cáncer cervical, pero sí el riesgo de padecer la infección viral.

En la muestra de pacientes que hemos estudiado en este trabajo, la edad promedio correspondió a $32,6 \pm 6,6$ años, sin que se demostrara una relación entre ese parámetro y la positividad a la prueba de VPH. Igualmente, en éste grupo de edad las infecciones en el tracto genitourinario ocasionadas por *Chlamydia trachomatis* siguen siendo padecimientos que representan serios problemas de salud pública, a pesar de los grandes avances en las tecnologías diagnósticas y en tratamientos médicos. Se requiere de mayores evidencias de su impacto en la salud humana, sobre todo cuando *C. trachomatis* coexiste con otros gérmenes dañinos.

Del grupo de mujeres que estudiamos el 71,5% correspondía a parejas con infertilidad, por factor infeccioso (59% primaria y 12,5% secundaria) mientras que el 28% acudieron solicitando atención por infección genital o urinaria aun teniendo antecedentes de trastornos reproductivos.

En diferentes estudios que ha realizado nuestro grupo en parejas del norte de México con infertilidad, aborto y fracaso en tratamientos de reproducción asistida hemos detectado constantemente la presencia de *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum* asociados al problema. Hemos descrito en pacientes de la consulta andrológica alteraciones seminales como la bacteriospermia sin leucocitospermia, la fagocitospermia y el daño estructural y molecular asociado de los espermatozoides con niveles elevados de fragmentación de la cromatina espermática, en las parejas de mujeres con aborto recurrente, fracaso de inseminaciones y procedimientos de fertilización *in vitro* (Gallegos *et al.*, 2008).

Después de haber confirmado que un porcentaje muy elevado de parejas del norte de México con incapacidad de procrear presentan infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum* en los conductos y órganos de la vía seminal en el hombre y del endometrio en las mujeres (Gallegos *et al.*, 2008; Gallegos-Ávila *et al.*, 2009; Chavez-Briones

et al., 2013; Gallegos-Ávila *et al.*, 2013), nos hemos enfocado a la investigación de los aspectos clínicos y de patogenicidad así como del manejo terapéutico integral de las infecciones genitales internas integrando las patologías reproductivas del hombre y de la mujer, en lo que hemos llamado “binomio gineco-andrológico del factor infeccioso de la infertilidad (Gallegos-Ávila *et al.*, 2013). Sin embargo éste es el primer trabajo que llevamos a cabo para analizar la importancia de la presencia de VPH en esta población.

Un grupo de patologías que conducen a infertilidad de la pareja está relacionado con la coexistencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* y otros gérmenes, entre ellos el Virus del Papiloma Humano y, aunque recientemente algunos autores no han logrado comprobar el efecto cooperador entre estos dos tipos de microorganismos en el desarrollo del carcinoma de cuello uterino, se sigue indagando sobre ésta posible acción (Luostarinen *et al.*, 2004, Dunne & Park, 2013). Las re-infecciones por *Chlamydia trachomatis* son comunes y pueden aumentar el riesgo de secuelas ginecológicas, obstétricas y reproductivas (Evans *et al.*, 2009; Bachir & Jarvi, 2014), pero ignoramos si bajo esta condición el VPH sea también persistente y en qué grado participe en los daños tisulares que subyacen en el fallo reproductivo, el aborto espontáneo y la ruptura prematura de membranas fetales.

Los resultados de este estudio, realizado en 104 mujeres que se presentaron para atención médica de problemas reproductivos o infecciones genitourinarias recurrentes y resistentes a tratamientos, y a quienes se les practicó estudios diagnósticos para detección de VPH a partir del exudado cervicovaginal y de paredes vaginales, señalan la presencia del virus en 51 (49%) de las muestras, una de las cifras de mayor prevalencia reportadas en la literatura, comparable con las reportadas en grupos con aborto espontáneo (Hermomat *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2008; Bennani *et al.*, 2012). Sin embargo el diagnóstico del VPH y de gérmenes inespecíficos, como *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum*, puede fallar si las muestras analizadas no son representativas de la región infectada del tracto genital y de acuerdo al método diagnóstico utilizado.

Una limitación de nuestro estudio fue el número de sondas específicas para los distintos VPH que se utilizaron a lo largo de los 10 años en que se estudiaron las pacientes, en función de los cambios en la tecnología que se fueron dando; sin embargo, esto ha

sucedido en la mayoría de las publicaciones que encontramos en la bibliografía, de ahí que la prevalencia de la infección dependa no solo del grupo de estudio, sino del tipo de muestra analizada y de los virus que se hayan podido rastrear. De acuerdo a los datos que obtuvimos en esta población del norte de México, los genotipos más frecuentes fueron el VPH 6 (19,2%), el VPH 16 (11,5%), el VPH 18 (12,5%), el VPH 52 (7,2%) y con el mismo porcentaje (6,7%) los VPH 58 y 11.

Para la interpretación de los resultados de esta tesis deberá tenerse también en cuenta, que se parte de diagnósticos hechos a lo largo de la atención recibida por las pacientes y que para esto se incluyó el uso de antibióticos para los gérmenes diagnosticados a la llegada de las pacientes a la consulta. Los más frecuentes correspondían a *Chlamydia trachomatis*, 86,5%, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*, sumando entre éstas dos bacterias, el 82,7%. Los tratamientos previos a la aplicación de pruebas diagnósticas para VPH pudieron modificar los resultados de la asociación entre el virus en cuestión y el resto de gérmenes en estas pacientes que al final padecían infecciones multimicrobianas.

Puesto que las lesiones que afectan a la capacidad reproductiva en la mujer suceden como consecuencia de procesos inflamatorios por infección crónica de los órganos genitales internos, tendríamos que considerar *a priori* que la probabilidad de que fueran causadas por un solo germen debería ser mínima. Tal y como observamos en las pacientes seleccionadas para este trabajo, diferentes autores también han demostrado la existencia de infecciones multimicrobianas, en patologías asociadas a la infertilidad, en relación con alteraciones de la microbiota vaginal (Cohen *et al.*, 2002; Sweet & Gibbs, 2002; Simms *et al.*, 2003; Hebb *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2014).

Bajo condiciones fisiológicas, la llegada de gérmenes patógenos al útero y cavidad pélvica se ve impedida por la fuerte barrera que representa la presencia de lactobacilos en armonía con el epitelio vaginal (Verstraelen *et al.*, 2010; Shipitsyna *et al.*, 2013), aunque este equilibrio puede verse afectado por la llegada de moléculas de inflamación y microorganismos del semen en la relación sexual (Borovkova *et al.*, 2011).

Diversos estudios han relacionado los desequilibrios de la microbiota vaginal y la disminución de la concentración de *lactobacilos*, característica de la vaginosis bacteriana,

con el mayor riesgo de contraer gérmenes de transmisión sexual y de padecer inflamación pélvica y complicaciones obstétricas y reproductivas (Wiesenfeld *et al.*, 2003; Ness *et al.*, 2005; Spear *et al.*, 2007; Cherpes *et al.* 2008; Hillier *et al.*, 2008). Nuestros resultados concuerdan con los de estos autores, al haber encontrado cambios de la microbiota vaginal en relación inversa con la presencia de VPH ($p = 0,03$) y pudiéramos considerar que en algún momento de la enfermedad permitieron la llegada de los gérmenes presentes en el exudado cervicovaginal a la cavidad uterina, al oviducto y a la cavidad pélvica.

Chlamydia trachomatis fue el germen encontrado con mayor frecuencia en las mujeres de este estudio (86,5%), presentándose por igual en los casos VPH positivos y VPH negativos. Habrá que considerar en este punto que siendo éste un estudio observacional y descriptivo, la aplicación de una prueba molecular para la detección de ADN del VPH se hizo únicamente cuando se observaron lesiones en el cérvix uterino o en las paredes vaginales, y la observación de coilocitos en un estudio citológico en fresco (no en el Papanicolaou), compatibles con la infección por el VPH. Otro motivo para la realización del estudio de detección del VPH fue la reaparición de algunos síntomas de vaginitis que ya no tenían una explicación clara ante la disminución de la carga bacteriana consecuente al tratamiento seguido de acuerdo al diagnóstico microbiológico inicial.

En cambio la presencia de *Ureaplasma urealyticum*, en 29 de las 51 muestras de exudado cervicovaginal, se encontró asociada con la presencia de VPH, mientras que los 22 casos restantes de muestras con *Ureaplasma urealyticum* fueron negativos en la prueba de PCR para ADN del VPH. Esta asociación fue estadísticamente significativa ($p=0,05$). Consideramos que esta observación es de suma importancia ya que algunos autores han reportado la asociación de VPH con especies de mycoplasmas y ureaplasmas en mujeres con citología cervical anormal y lesiones intraepiteliales de alto grado (Lukic *et al.*, 2006; Biernat-Sudolska *et al.*, 2011). En estudios que hemos realizado previamente, observamos una asociación constante entre *Ureaplasma urealyticum* y *Chlamydia trachomatis* en infecciones genitales internas de parejas con dificultad para la procreación, observando la existencia de la infección desde varios años atrás y su persistencia por 6 o más meses de tratamiento (Gallegos-Ávila *et al.*, 2009; Gallegos Ávila *et al.*, 2011b; Chávez-Briones *et al.*, 2013).

En nuestra experiencia clínica en el estudio de mujeres con infección genital interna crónica con participación de *Ureaplasma urealyticum*, es frecuente que en las primeras muestras de exudado cervicovaginal la bacteria no forme parte de los gérmenes detectados en los cultivos con medios específicos para su aislamiento e identificación. El germen que encontramos con más frecuencia, al inicio de la evaluación de las parejas que acuden por infertilidad ha sido *Chlamydia trachomatis* tanto en exfoliado de la uretra masculina como en el del cérvix uterino; en cambio en el análisis del líquido seminal de las parejas, junto a la *Chlamydia trachomatis*, encontramos *Ureaplasma urealyticum* un porcentaje muy elevado de los casos (95%), y en un porcentaje menor, el *Mycoplasma hominis* (datos no publicados).

Diversos autores han referido que los espermatozoides son vehículo de transporte de bacterias seminales, como *Ureaplasma urealyticum* y la *Chlamydia trachomatis*, que se internalizan en los órganos genitales de la mujer al momento de la relación sexual (Keane *et al.*, 2000; Gdoura *et al.*, 2008). Lo mismo pudiera suceder con el VPH, ya que se ha confirmado que se adhiere a la cabeza espermatozoide (Perez-Andino *et al.*, 2009; Foresta *et al.*, 2010).

Como consecuencia a la infección intrauterina se producen secreciones infectadas que se mantienen todo el tiempo en contacto con el anillo cervical interno y el conducto cervical. La inflamación crónica, producida a ese nivel ocasiona una fibrosis y estrechamiento gradual que llega a ser severo (Gonçalves *et al.*, 2002). Varios de los signos y síntomas de infección genital interna dependen de estas lesiones. Un ejemplo es el dolor menstrual intenso, que se despierta para vencer el obstáculo que representa el cierre del anillo cervical interno y la mínima expulsión de las secreciones acumuladas en la luz de la cavidad uterina, procedentes de las glándulas endometriales infectadas, que se incrementan sobre todo en la fase secretoria. Es así que las pacientes presentan mayor leucorrea en el período premenstrual.

En la exploración de las pacientes que estudiamos para esta tesis, 56,5% presentaban estenosis del conducto cervical y 55,4% referían dolor menstrual moderado a muy intenso; 44,5% presentaron secreción moderada a abundante, saliendo por el orificio cervical, mientras que 30,4% tenían, al momento de la exploración vaginal, solo escasa secreción, lo

que coincide en forma aproximada con el 28,3% que tenían ocluido el orificio cervical externo.

A pesar de que entre las causas de infertilidad en la mujer se reconoce clásicamente un “factor uterino”, el examen histopatológico de la biopsia endometrial no está contemplado dentro de los protocolos para estudio de la infertilidad, ni para la selección de pacientes para tratamientos de reproducción asistida, pero sí se realiza cuando hay irregularidades en la menstruación en cuanto a la frecuencia y cantidad del sangrado (menorragia, metrorragia, polimenorrea y polimenorragia); en esos casos la biopsia de endometrio demuestra alteraciones tisulares, como hiperplasia endometrial, endometritis crónica no específica, pólipos endometriales, endometrio con disociación de la maduración, endometrio atrófico, metaplasia escamosa y, en algunos casos, neoplasias (Muzaffar *et al.*, 2005; Khare *et al.*, 2012).

El propósito de este trabajo no incluyó analizar los cambios evolutivos de las lesiones ni los tratamientos implementados. Sin embargo, consideramos importante aclarar que los cultivos en medios selectivos para *Ureaplasma urealyticum* fueron positivos una vez que un programa tratamiento médico diseñado *ex profeso*, con agentes multienzimáticos y mucolíticos y exfoliantes epiteliales, además de los antibióticos específicos, logró permeabilizar, aunque no fuera en su totalidad, el conducto cervical (Gallegos-Ávila *et al.*, 2013). La constante expulsión de ureaplasmas, a lo largo de 6 o más meses de tratamiento se asocia a la persistencia del germen en el estroma endometrial (Chavez-Briones *et al.*, 2013). Descartando nuevos contagios y considerando que el tropismo del VPH no es exclusivo de los epitelios estratificados mucosos o queratinizados sino que también infecta epitelio glandulares (Anciaux *et al.*, 1997; Ault, 2006) es posible que este tiempo sea necesario para que el VPH aparezca en las secreciones cervicales o de las paredes vaginales y ocasione nuevas molestias en las pacientes además de lesiones sospechosas de la infección viral.

Esta pudiera ser la explicación de que en este estudio encontremos una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del VPH y el *Ureaplasma urealyticum*, ($p=0,05$). La asociación del VPH con *Chlamydia trachomatis* podría haber estado influida por

esta misma circunstancia. En un estudio clínico controlado pudiera programarse un rastreo uniformizando de algunas variables para estos gérmenes, los signos y síntomas asociados y la evolución bajo tratamiento.

Independientemente de que el VPH estuviera presente desde el inicio de la infección por *Ureaplasma urealyticum* y *Chlamydia trachomatis*, o que se agregara en el curso de la atención de la paciente, esta combinación de gérmenes puede ser de suma importancia como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer genital, tomando en cuenta las múltiples publicaciones en las que se describe la asociación VPH/*Chlamydia trachomatis* como condición que incrementa el riesgo de cáncer del cuello uterino (Muñoz *et al.*, 2006; de Lucena Oliveira *et al.*, 2008; Paba *et al.*, 2008).

Se ha afirmado que la oncogénesis mediada por *Mycoplasma*, tiene un largo tiempo de latencia y requiere una cronicidad de la infección. Dos décadas atrás, Tsai *et al.*, refirieron el potencial oncogénico de la especie *Mycoplasma*, en la que entonces estaba incluido el *Ureaplasma urealyticum*, cuando la infección era persistente y originaba transformación celular maligna (Tsai *et al.*, 1995). En épocas más recientes, estudios experimentales han confirmado la inducción de alteraciones en la expresión génica en células prostáticas y cervicales que llevan a transformación maligna (Zhang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006).

Estudios epidemiológicos han señalado como factores de riesgo para padecer una ETS ser una persona soltera sexualmente activa, tener múltiples compañeros sexuales, usar anticonceptivos orales o dispositivos intrauterinos, tener historia previa de ETS y padecer síntomas como flujo y dolor abdominal vago (Cates, 1991; Faro, 1991; Kihlstrom & Danielsson, 1994).

Como planteamos en la introducción de éste trabajo los factores de riesgo para adquisición y transmisión del VPH son en su mayoría comunes a las de otras infecciones de transmisión sexual, por lo que habrá una amplia posibilidad de que varios de estos gérmenes coexistan, por tiempo prolongado, en los órganos afectados. Dependiendo del tipo de gérmenes implicados podrá haber o no una coincidencia de mayor importancia para la salud reproductiva y el riesgo de cáncer.

En la tabla XIV se resume la influencia de los factores de riesgo para VPH, en población mexicana, entre los cuales incluyó la presencia de otra ITS concomitante (Carreras-Collado *et al.*, 2007).

Tabla XIV. Factores de riesgo para adquisición y transmisión del VPH.

	Modula la probabilidad de exposición del VPH	Modula la probabilidad de transmisión del VPH	
		Infectividad/duración	Susceptibilidad
Iniciación sexual temprana	↑		↑
Mayor número de parejas	↑		
Similitud o diferencia entre individuos y sus parejas	↑ / ↓		
Nueva pareja	↑		
Parejas concurrentes/ parejas distintas a la habitual	↑		
Intervalo de tiempo breve entre parejas	↑		
Infección concomitante con otra ITS	↑	↑	↑

Carreras RC. Virus del Papiloma y Cáncer. Ed. Panamericana, 2008.

De acuerdo a nuestros resultados, la presencia de VPH en el exudado cervicovaginal fue más frecuente en función del número de parejas sexuales ($p=0,05$). Ya fuera que las pacientes estudiadas hubieran acudido por infertilidad o por infección genitourinaria activa, *C. trachomatis* fue la bacteria más frecuente (86,5%), bacteria considerada como la más frecuente entre la de transmisión sexual. Aunque su presencia se observó por igual en los casos en que se pudo comprobar positividad a la PCR para VPH el efecto cooperador entre estos dos gérmenes ha sido referido reiteradamente por diversos autores.

En el grupo de pacientes estudiadas, 67 refirieron como antecedente de su atención ginecológica en años anteriores, la realización de citologías por el método de PAP interpretadas por los citopatólogos como con “proceso inflamatorio inespecífico” 33 casos, con “cambios de metaplasia” en 27 casos y “con displasia” en 7 pacientes. El antecedente de “cambios inflamatorios inespecíficos” también referidos en algunos de los informes de los

patólogos como “Papanicolaou clase II”, fueron más frecuentes en el grupo VPH. Ninguno de estos datos tuvo una asociación con el diagnóstico de VPH.

En las mujeres que refirieron el antecedente de haber padecido infección por VPH tiempo atrás, se detectó el ADN del VPH con mayor frecuencia que en aquellas que no refirieron ese antecedente ($p=0,0001$). No se observó lo mismo con respecto al antecedente de haber padecido previamente a su atención por infertilidad, infección por *Chlamydia trachomatis*, ya que solamente 25 pacientes confirmaron este dato, 21,6% de las mujeres con VPH positivo y 26,4% de las negativas en la prueba de PCR para VPH. Este dato debe interpretarse con reserva ya que la asociación de VPH y *Chlamydia trachomatis*, ha sido reportada por diversos autores (Samoff *et al.*, 2005; Silins *et al.*, 2005).

Sin que hubiera una asociación con la presencia de VPH, los resultados de este estudio indican que *Escherichia coli* y *Cándida albicans* estuvieron presentes en las secreciones cérvico-vaginales de la muestra de pacientes estudiadas, tal como se ha informado en otros trabajos (Liu *et al.*, 2003; Borovkova *et al.*, 2011). Sin embargo, el porcentaje de casos en los que fue detectada *Cándida albicans* (17,3%) fue mucho menor que el 40% que se ha referido en población de mujeres que acuden a centros de primer nivel de atención con candidiasis vulvovaginal. Esta entidad es considerada una de las enfermedades infecciosas de mayor prevalencia a nivel de la vagina; se estima que el 75% de las mujeres tendrán al menos un episodio de candidiasis vulvovaginal en su vida, principalmente entre los 20 y 40 años de edad y el 5% de las mujeres tienen candidiasis vulvovaginal recurrente, con 4 o más episodios al año (Eckert & Lentz, 2007; Ilkit & Guzel, 2011; Bradford *et al.*, 2013).

En congruencia con la baja prevalencia con la que se aisló *C. albicans*, los signos y síntomas característicos de la candidiasis vulvovaginal, prurito y ardor vaginal severo, se presentaron con poca frecuencia (11,5% y 13,5% respectivamente) en las mujeres que estudiamos, que como antes aclaramos habían avanzado ya, en el tratamiento de las infecciones genitourinarias. En cambio la presencia de infección vaginal inespecífica y de uretritis recurrentes fue referido como antecedente al inicio de la atención solicitada, por un alto porcentaje de las mujeres (71,2% y 58,7% respectivamente), aunque éste dato no tuvo asociación con la presencia de VPH en el exudado cervicovaginal.

Es frecuente que en la consulta de infertilidad se presente un alto porcentaje de mujeres que presentan antecedentes de episodios agudos de EPI, de infecciones endometriales crónicas, subclínicas y de cérvico-vaginitis recurrente.

Aún sin un diagnóstico microbiológico, la mayoría de estas pacientes refirieron como antecedente haber sido tratadas con antimicóticos tópicos cuando llegaron a presentar signos y síntomas de vaginitis. En 18 casos con antecedente de ulceración del exocérnix fueron tratadas mediante criocirugía y en 6 pacientes con antecedente de infecciones recurrentes y resistentes a los tratamientos médicos previos fallidos se llegó a la histerectomía por lesiones asociadas a infección persistente. En los casos de las mujeres seleccionadas para este estudio, el síntoma predominante fue el dolor pélvico, presente en el 69,9% de ellas y referido como de grado moderado a severo por el 47,6%. La distensión abdominal acompañante, su presentación mayormente perimenstrual y la disminución importante o desaparición total del dolor después de tratamiento antibacteriano y agentes multienzimáticos como tratamientos de apoyo (Gallegos-Ávila *et al.*, 2013) permiten interpretarlo como parte de la infección pélvica que padecían las pacientes. Sin embargo al analizar si la EPI era más frecuente en el grupo con VPH que en el grupo en el que no se encontró ADN para VPH, no encontramos diferencias significativas.

La Enfermedad Pélvica Inflamatoria puede comprender lesiones agudas o crónicas del útero, trompas de Falopio y estructuras pélvicas adyacentes. Se ha comprobado que existe una alta incidencia de infertilidad ocasionada por factor tubárico en mujeres que no han cursado con sintomatología de inflamación pélvica (Sweet & Gibbs, 2002; Hebb *et al.*, 2004); en el presente estudio 9,8% de las pacientes tenían obstrucción tubárica unilateral o bilateral y en un porcentaje igual se diagnosticó la presencia de adherencias pélvicas y endometriosis mediante laparoscopia exploratoria. Si bien la presencia de estas patologías presentes comúnmente en la EPI no tuvieron ninguna asociación con la ausencia o presencia de VPH en este estudio, pudieron ser consecutivas a la infección por *Chlamydia trachomatis*.

Varios estudios científicos han demostrado una fuerte asociación entre la infertilidad ocasionada por factor tubárico y las infecciones previas por bacterias de comportamiento biológico atípico, como *Chlamydia trachomatis*, sin que se haya presentado sintomatología

clínica aparente que indique inflamación pélvica y a pesar de que sean administrados algunos agentes terapéuticos (Wiesenfeld *et al.*, 2002; Kodaman *et al.*, 2004; Svenstrup *et al.*, 2008; Wiesenfeld *et al.*, 2012). Aunque sutil y vago, el cuadro clínico observado en esas pacientes corresponde al descrito clásicamente para la infección genitourinaria.

En la presente Tesis las pacientes presentaron signos y síntomas en asociación sindrómica: uretritis (51%), vulvovaginitis (48%), cervicitis crónica hipertrófica (56%), con lesiones de la superficie externa del cuello uterino (63%) y de tipo mucopurulenta (75%).

La leucorrea, manifestación regularmente asociada a la vulvovaginitis, fue referida como evidente en poco más del 40% de las mujeres que estudiamos, aunque frecuentemente era considerada por ellas como “normal”. Sin embargo en la exploración vaginal cerca del 75% presentaban secreción densa, mucosa, de color blanco o blanco amarillento (63,7%) o de color café claro a café oscuro (14,9%) que las pacientes no reconocían haber visto salir en forma espontánea.

En un estudio previo a esta tesis, sobre la histopatología de biopsias de mujeres con infertilidad o abortos tempranos, se describe la presencia de *Chlamydia trachomatis* y bacterias con pleomorfismo y dimensiones características del *Ureaplasma urealyticum* en asociación con datos clínicos característicos de la endometritis crónica o subaguda (Chávez-Briones *et al.*, 2013), que también encontramos en las pacientes que se seleccionaron para este estudio. Cuando tratamos de analizar si esta sintomatología difería en algo, comparando casos con y sin VPH en el exudado cervicovaginal, no se encontraron diferencias entre ambos grupos, a excepción de la presencia de secreción mucoide blanca presente en el fondo de saco vaginal, que de acuerdo al análisis estadístico realizado, resultó estar asociada a la presencia de VPH con un valor de $p=0,05$.

Pocos estudios han descrito cambios menstruales asociados a la infección por VPH, pero recientemente, en una investigación de pacientes con citologías anormales y positivas para VPH 16 y/o 18, que acudían a la revisión ginecológica de rutina, con multiparidad, infecciones vaginales crónicas, sangrado postcoital, además de sangrado transvaginal en mujeres post menopáusicas, se encontró una asociación entre la positividad al VPH con irregularidades de los ciclos menstruales, una menor duración del sangrado menstrual, la

presencia de infección vaginal y la observación de un cérvix anormal datos clínicos ginecológicos (Elkharashy *et al.*, 2013).

En éste estudio la disminución de la cantidad y duración del sangrado menstrual, definida como oligomenorrea, se consideró evidencia clínica de endometritis crónica al igual que los cambios de color y densidad o viscosidad del fluido menstrual, siendo la menstruación más anormal, de color café marrón, café muy oscura o casi negra (39,1%), muy densa, con moco viscoso (18,4%), y en ocasiones casi sólida, grumosa o pastosa (21,6%) y de olor fétido. Conociendo que la sangre menstrual no coagula por no contener todos los factores de la coagulación, la presencia de coágulos que fue referida por el 73,9% de las pacientes, se consideró anormal y pudiera asociarse con hipersecreción mucosa de las glándulas endometriales infectadas. La expulsión de “coágulos” grandes, referida por 48,9% de la mujeres, se acompañó en aproximadamente la mitad de las pacientes de distensión pélvica y en 37,5% de dolor pélvico severo e incapacitante.

El sangrado normal, del color rojo claro brillante estaba presente solo en el 16,3% de las pacientes y la consistencia fluida, sin moco notable, solo era observada en el 22,6% de las mujeres de este estudio. Resulta sorprendente que aspectos básicos de las características normales de un fluido corporal como es la descarga transvaginal de sangre procedente del despegue endometrial no se haya caracterizado físicamente y que las mujeres no tengan información de los cambios que pueden observarse cuando existe una infección intrauterina. Solo muy recientemente podemos encontrar estudios que se dirigen a analizar el sangrado menstrual. Algunos de ellos se han centrado en el contenido de leucocitos, células inmunocompetentes y su caracterización comparándolo con el fenotipo linfocitario de la sangre periférica (Salamonsen & Lathbury, 2000; Sabbaj *et al.*, 2011; Van der Molen *et al.*, 2014) pero no hemos encontrado información que caracterice los cambios en aspectos cualitativos del sangrado menstrual en la endometritis crónica.

Sin que observáramos una asociación con el VPH, los datos que en este trabajo se refieren a este aspecto son muy consistentes en la descripción del sangrado menstrual en su densidad y color, no solo en la cantidad, como podría ser considerado de acuerdo al término oligomenorrea, usualmente en asociación a la endometritis.

Nos parece importante señalar, tomando como referencia nuestros resultados, que la presentación previa o posterior al sangrado menstrual de una descarga de material de color café claro, rojizo u oscuro, cuya consistencia varía de mucoide a pastosa o grumosa, es un indicador de la endometritis severa y crónica.

Mientras que los signos y síntomas de la infección genital interna por VPH son poco específicos y en el grupo que estudiamos pudieran resultar de la suma de acciones lesivas de los múltiples gérmenes presentes, las lesiones cutáneas o de la mucosa vaginal son de percepción más fácil y característica. Concordando con las descripciones de Dunne (Dunne & Park, 2013) en 22 de las pacientes de este estudio, la presencia de verrugas anogenitales se manifestó en forma de pequeñas pápulas lisas y aplanadas o pedunculadas. En 52 mujeres de nuestro estudio aparecieron lesiones de superficie rugosa, de color rosa o blanco, y consistencia blanda, principalmente en la mucosa de las paredes vaginales.

En la mayoría de los estudios revisados en este trabajo, en los que se intentó relacionar la presencia de VPH en parejas que presentan problemas en su función reproductiva, fracaso de la fertilización *in vitro* y abortos espontáneos, no se hace referencia a la coexistencia del VPH con otros gérmenes, como causantes de las alteraciones citológicas, lesiones cervicales o deciduitis (McLaren *et al.*, 1999; Goldenberg *et al.*, 2000; Hernández-Girón *et al.*, 2005; Van Hamont *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Perino *et al.*, 2011; Skoczynski *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2013).

En este estudio, 53 de las 78 pacientes que acudieron por infertilidad con factor causal infeccioso, habían recibido tratamientos previos de reproducción asistida, incluyendo 38 que habían sido tratadas con inseminaciones intrauterinas y 15 con FIV/ICSI. Únicamente 4 mujeres lograron un embarazo por alguno de estos procedimientos, y en ninguna de ellas el embarazo prosiguió más allá de la cuarta semana. De las pacientes que tenían como antecedente tratamientos de reproducción asistida con resultado desfavorable, 31 formaban parte del grupo VPH positivo (58,49%) y 41 del grupo VPH negativo (41,5%); sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa con un valor de p de 0,48. Entre una y 4 pérdidas gestacionales tempranas fueron referidas como antecedente o

motivo de consulta por 28 mujeres, que se distribuyeron prácticamente sin diferencia entre los dos grupos, con y sin VPH.

Al igual que varios estudios previos, estos datos no logran establecer una asociación entre la presencia de VPH en el exudado cervicovaginal y el resultado de la reproducción asistida ni el antecedente de aborto espontáneo (McLaren *et al.*, 1999; Goldenberg *et al.*, 2000; Hernández-Girón *et al.*, 2005; Van Hamont *et al.*, 2006; Perino *et al.* 2011; Skoczynski *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2013).

Sin embargo, en un estudio de 106 mujeres con test negativos para HIV, chlamydia, gonorrea, y sífilis, sin alteraciones citológicas en el PAP y sin datos clínicos de VPH, se detectó VPH en el 16% de los casos. Un porcentaje menor de las pacientes con VPH resultaron con prueba de embarazo positiva después de la fertilización *in vitro* en comparación con las pacientes sin VPH (23,5% vs. 57%); aunque esa diferencia no resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,2$), se ha considerado que esta tendencia pudiera ser aclarada al incluir un mayor número de pacientes en nuevos estudios (Spandorfer *et al.*, 2006).

Por razones éticas, no llevamos a cabo estudios que consideramos de riesgo para la expansión del proceso infeccioso genital interno, como es la biopsia endometrial o el muestreo de secreciones de la cavidad uterina, estando el proceso infeccioso “intacto” y aún indefinido al inicio de los tratamientos. La presencia de lesiones cervicales severas, como la estenosis del conducto cervical antes descrita, la cervicitis hipertrófica mucopurulenta, que presentaban más del 50% de las pacientes de este trabajo de investigación, fueron algunos de los indicadores clínicos que consideramos limitantes para indicar de primera intención la introducción de una cánula para extracción de fluidos de la cavidad uterina o realizar una biopsia endometrial.

Aún con estas limitantes y realizando el muestreo solo de las secreciones cervicovaginales, este trabajo permitió reconocer la presencia de VPH en el 49% de la población estudiada; los genotipos de alto riesgo más frecuentes en el grupo de mujeres que estudiamos fueron el VPH 16 (23,1%), VPH 18 (25%), VPH 52 (13,5%) y con la misma

frecuencia, los VPH 31 y VPH 60 (9,6%) además de los VPH 6/11, catalogados como de riesgo bajo para cáncer.

Algunos otros estudios en población mexicana han investigado la presencia de VPH y su asociación a trastornos reproductivos. Conde-Ferrález et al, en 2013, investigaron los genotipos 16, 18, 58, 11 y 6, en exudados cervicales de 143 mujeres que estaban siendo atendidas por aborto espontáneo y 281 mujeres con embarazo a término, en hospitales del Instituto Mexicano de la Seguridad Social, en Mérida, Yucatán. Sus resultados indican una prevalencia global de 19,8%, 24,4% en las mujeres con aborto, que se incrementó a 27,3% cuando hubo antecedente de una pérdida gestacional previa, y 15,2% en las mujeres con embarazo a término. Los tipos de VPH encontrados con mayor frecuencia fueron el 16 y el 58. Estos autores refieren en su estudio la concurrencia de más de un genotipo de VPH en 8 de 55 (14,54%) de las muestras positivas (Conde-Ferrález *et al.*, 2013).

Comparativamente en nuestro trabajo, llevado a cabo tanto en pacientes con aborto como en pacientes subfértiles, con fertilización *in vitro* e inseminaciones múltiples fallidas, hemos encontrado un porcentaje mayor, 60%, de los casos positivos, con presencia de más de un VPH y observamos asociaciones entre VPH de alto riesgo (46,3%), asociaciones de VPH de alto y de bajo riesgo (44,8%) y asociaciones de VPH de bajo riesgo (20,5%). Una estimación derivada de estos datos indica que el 79% de los casos con VPH tendría un riesgo potencialmente alto para padecer cáncer cérvico uterino al momento de este estudio.

Nuestro estudio se ha centrado en población que intenta o ha intentado lograr embarazo sin conseguirlo, a pesar de tratamientos que incluyen las inseminaciones intrauterinas y la reproducción asistida. Al haber encontrado VPH en la mitad de ellas como parte de los gérmenes que constituyen el factor infeccioso que se asoció al fallo reproductivo, cabe preguntarnos cuál será el comportamiento del virus en caso de que un embarazo sucediera ante la infección por VPH. En ese caso el estado inmunológico de la mujer gestante puede representar un riesgo de expansión para la infección del VPH y su transmisión al producto de la gestación.

Hace ya más de dos décadas, las primeras investigaciones obtenían una prevalencia de VPH en mujeres embarazadas que iba del 5 al 80%, un riesgo de infección por VPH mayor en

mujeres embarazadas que en no embarazadas y con un mayor número de embarazos. (Smith *et al.*, 1995; Chang-Claude *et al.*, 1996). Los estudios sobre la prevalencia del VPH en el embarazo difieren de forma importante en las diversas investigaciones llevadas a cabo a lo largo de más de dos décadas en diferentes partes del mundo.

En un estudio realizado en Pensilvania, EUA, (Gómez *et al.*, 2008) se detectó VPH más frecuentemente en placentas de partos pre término por ruptura prematura de membranas o trabajo de parto pretermo de causa no conocida, que en los controles: placentas de parto pre término por preclamsia; la diferencia encontrada fue estadísticamente significativa ($p=0,03$). En otro trabajo de investigación, se encontró ADN de VPH en el 17,7% de productos de aborto y 24,4% en placentas de productos nacidos a término (Skoczynski *et al.*, 2011). Un par de años después, investigadores de un hospital de Seúl (Corea) presentaron datos que confirmaban una asociación entre la ruptura prematura de membranas y el parto pre término con la presencia de VPH, estudiando exudados cervicales de 311 mujeres a las 6 semanas postparto, incluyendo en el rastreo los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, y 68. La prevalencia del VPH en el grupo con ruptura prematura de membranas fue de 27,3%, con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control siendo el valor de $p=0,02$ (Cho *et al.*, 2013).

Estudios hechos en México dieron como resultado una prevalencia de 37,2% en 272 mujeres embarazadas en una región del centro de del país (Hernández-Girón *et al.*, 2005), mientras que, en estudios posteriores, se informó de la presencia de ADN de VPH con una frecuencia de 75%, en placentas y exudados cervicales de mujeres embarazadas pertenecientes a población de la costa del pacífico (Urribarren-Berrueta *et al.*, 2012).

El tipo de VPH presente también ha variado de en las publicaciones que hacen referencia a distintas poblaciones: en los Estados Unidos se determinó una prevalencia de 29% de VPH en mujeres embarazadas, siendo los genotipos más frecuentes el VPH 16 (21%), el VPH 31 (12,7%), el VPH 18 (9%), el VPH 51 (9%), y los VPH 6 y 11 con una prevalencia del 6% (Smith *et al.*, 2004). En España se ha encontrado una prevalencia del 6,5% con predominio de los genotipos VPH 16 y del 6/11 (Castellsagué *et al.*, 2009, de Vuyst *et al.*, 2009). Estos autores han indicado el riesgo de transmisión del VPH de la madre al hijo y la

probabilidad de que se asocie a la aparición de lesiones papilomatosas en orofaringe y laringe de hijos nacidos de madres con VPH.

Esto último, además del riesgo potencial de desarrollo de lesiones malignas por el VPH, sobre todo si se asocia a otros gérmenes de reconocida influencia oncogénica, como son *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum* en mujeres en tratamientos para fertilidad, tendrá que tomarse muy en cuenta en los protocolos diagnósticos y de tratamiento de este grupo de pacientes.

En este estudio no hemos tenido acceso a tejido placentario o membranas fetales ni hemos estudiado aún tejido endometrial o secreciones intrauterinas para detectar ADN de VPH. Sin embargo, la hipótesis de expansión ascendente del VPH y otros gérmenes, actualmente aceptada, permitiría inferir que el VPH se localizaría no solo en el cérvix uterino, sino que la infección latente existiría también dentro del útero, en el grupo de pacientes estudiadas.

El tener como limitante que la muestra analizada incluyó solo el 27,5% con antecedente de pérdida gestacional temprana, no permite hacer un análisis estadístico retrospectivo que fuera válido para determinar la asociación de VPH con el antecedente de esa complicación obstétrica. La misma limitación se tiene en el caso de los procedimientos de reproducción asistida infructuosos y su asociación con VPH, ya que el grupo de mujeres seleccionadas para este análisis incluyó solo 53, con antecedente de tratamientos reproducción asistida, incluyendo las inseminaciones intrauterinas.

El presente trabajo, llevado a cabo en un grupo del norte de México, investigó la prevalencia y genotipificación del VPH, centrándose en un grupo de mujeres con problemas de fertilidad y aborto, en el que el factor infeccioso causal incluye gérmenes con potencial oncogénico, como lo son además de los genotipos de VPH de alto riesgo, bacterias intracelulares como *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* (Lukic *et al.*, 2006; Biernat-Sudolska *et al.*, 2011). Los resultados que se obtuvieron nos permiten advertir que éste es un grupo de riesgo para desarrollo de patologías oncológicas uterinas sobre el que deberían implementarse programas de vigilancia especial con fines preventivos.

Tomando en cuenta la facilidad de transmisión de estos gérmenes al producto de la concepción, en caso de que tras los tratamientos de los procesos infecciosos y sus secuelas cicatriciales se consiguiera el embarazo, tendría que considerarse en primer término la vigilancia cercana del embarazo, el tratamiento antibiótico oportuno de recaídas de la infección durante el embarazo, para la prevención de pérdida gestacional y la necesidad de seguimiento clínico de los hijos nacidos de madres con éste tipo de infecciones.

Como hemos mencionado, el VPH se encontró con una frecuencia del 49% y aunque la cifra parece alta, hay que tomar en cuenta que el número de virus detectable por las técnicas que se fueron aplicando a lo largo de la integración de los casos para esta investigación, fue variando. Por ejemplo, para el 32,5% de las muestras, se aplicó PCR – Multiplex, que detecta solo de 6 a 8 genotipos y con ella se detectó VPH en 15 de los 34 casos estudiados; ésta circunstancia pudiera dar resultados falsos negativos en algunos casos; así la falta de asociación esperada, entre algunas lesiones citológicas o clínicas con el VPH pudiera tener una explicación.

Es indiscutible que el estudio de la citología cérvico vaginal sigue siendo un método de rastreo muy valioso en la prevención del cáncer cervical, e indispensable en la categorización de las lesiones premalignas y malignas. De acuerdo a las guías internacionales (Comprehensive Cancer Network, -NCCN-), la investigación de la presencia del VPH por PCR especialmente para las variantes 16 y 18, complementando a la citología de Papanicolaou y al examen ginecológico, resulta conveniente para el manejo clínico de las pacientes con citologías anormales. (NCCN.org. Updated NCCN guidelines for cervical cancer screening highlight, 2015. Disponible en: <http://www.nccn.org>).

En diversos estudios el diagnóstico de una citología por Papanicolaou normal o con proceso inflamatorio, no ha descartado la presencia de VPH (Bulk *et al.*, 2007; Safaeian *et al.*, 2007; Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Safaei, *et al.*, 2010; Elkharashy *et al.*, 2013).

Dentro de nuestra línea de trabajo, hemos aplicado un método de estudio citológico en fresco, en capa fina y base líquida, con tinciones supra vitales, que imprimen un alto contraste al contenido de la muestra, pero no permite detectar el grado de madurez de las células del epitelio cervical. Estas preparaciones citológicas examinadas a 400 y 1000

aumentos, se aplican al rastreo de gérmenes de dimensiones cercanas al límite resolutorio del microscopio de luz (200 nm), como son cuerpos elementales y reticulares de clamidia, micoplasmas y ureaplasmas. El análisis es semicuantitativo y los resultados se obtienen en 10 a 15 minutos. La observación de coilocitos con esta técnica, fue uno de los criterios aplicados para realizar la investigación del VPH, contando o no con citología por Papanicolaou. En un reporte parcial de un estudio comparativo entre el resultado de la prueba de PCR para VPH contra la observación de coilocitos en la citología en fresco, de 75 exudados cervicovaginales analizados para la presencia y genotipificación de VPH, 41,3% de los casos resultaron positivos, pero la concordancia con la observación de coilocitos en el preparado citológico en fresco fue de 41,93%. No obstante, en todos los casos positivos para el genotipo 51 y para la combinación de los genotipos 6 con 35 y 16 con 58 se observaron coilocitos en el examen citológico en fresco (Salas-Treviño *et al.*, 2015).

El tipo de gérmenes diagnosticados en este estudio, incluyó otros gérmenes de transmisión sexual en un elevado porcentaje: *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*. La asociación en este estudio de la presencia de VPH con el antecedente declarado por las mujeres seleccionadas para esta investigación de haber tenido múltiples compañeros sexuales, fue estadísticamente significativa, con lo que coincidimos al resto de los autores, que en consenso asumen este comportamiento como factor de riesgo para el contagio (Hernández-Girón *et al.*, 2005; Denks *et al.*, 2007).

Aun cuando el contagio hubiera sucedido muchos años atrás y la eliminación del virus fuera el evento más factible, la coincidencia con gérmenes que cambian las características físico-químicas de las secreciones glandulares y las vuelve hiperviscosas, pudiera influir en la evolución natural de la infección por VPH. La hiperviscosidad de la secreción del revestimiento epitelial puede llegar a ser un mecanismo de encubrimiento del VPH que evite la eliminación natural del germen, que se dice sucede en el 90 a 95% de los pacientes que se contagian de VPH. La hiperviscosidad del moco de revestimiento epitelial pudiera retardar o anular la exfoliación, como mecanismo normal de eliminación del germen. Hacen falta estudios que analicen la composición química e inmunológica de estas secreciones patológicas y las comparen con las normales. En esta área de conocimiento recientemente surgen los primeros datos, indicando entre otras características que la mayor parte de los

componentes del moco cervical tienen actividad de hidrolasas (Franco *et al.*, 1999; Grande *et al.*, 2015).

La administración a las pacientes de este estudio de un protocolo de tratamiento que incluye agentes mucolíticos, cuyo eficacia en la disminución de la viscosidad de las secreciones glandulares y la densidad del sangrado menstrual hemos comprobado (Gallegos-Ávila *et al.*, 2013), así como de palmitato de vitamina A como agente exfoliante, pudo haber interferido en los resultados de ésta prueba al favorecer la eliminación del virus y dar una prueba falsa negativa cuando el diagnóstico del VPH fue posterior a la aclaración del virus. Pero también podría haber permitido la detección del VPH, al exponer virus ocultos o localizados en estratos epiteliales profundos.

Un dato que resulta interesante es la edad promedio del total de las participantes en este estudio que fue de $32,6 \pm 6,6$ años, pero es necesario resaltar que un 64,4% de las pacientes tenían una edad igual o mayor a 30 años y que el 40% tenían 40 años o más. En otras poblaciones mexicanas estudiadas, se ha encontrado una edad promedio de 41,4 años en grupos de mujeres con VPH de alto riesgo y de 33,4 en grupos con VPH de riesgo bajo. En este trabajo la edad media del grupo estudiado fue mucho menor, de $31,6 \pm 6,4$ en el grupo de alto riesgo y de $36,2 \pm 6,9$ años en el grupo de bajo riesgo.

Los cambios en los estilos de vida que han sucedido en los últimos años incluyen situaciones que pueden considerarse de riesgo para el potencial de fertilidad en el género humano. Además del que haya varias parejas sexuales, si no simultáneas, en los años previos a la edad en la que se instaura la relación estable con una sola pareja, la búsqueda del embarazo se ha ido retrasando más allá de los 30 años. En el transcurso de esos años, permaneciendo las infecciones ocultas o “enmascaradas” por otros gérmenes más dañinos, que ocasionan síntomas llamativos, irían generándose ambientes inapropiados para la fecundación, la implantación embrionaria y ulterior embarazo.

Un porcentaje de pacientes, 44,2%, refirieron durante la elaboración de la historia clínica, el antecedente de “VPH” en citologías practicadas en años anteriores y/o “lesiones colposcópicas compatibles con VPH”. Las pacientes no dieron información respecto a biopsias de cérvix que se les hubieran practicado en consecuencia de esos hallazgos

citológicos o colposcópicos. La mayoría de las citologías cérvico-vaginales practicadas con anterioridad a las pacientes habían sido diagnosticadas “con presencia de procesos inflamatorios inespecíficos de leves a moderados”, que algunos patólogos refirieron en su reporte como “Papanicolaou clase II”. En el análisis estadístico practicado en éste estudio, no se estableció ninguna asociación entre ese antecedente, con el resultado de la prueba de PCR para el VPH practicada.

Independientemente de la resolución del problema reproductivo, las pacientes pudieran seguir expuestas al contagio sexual por VPH por tener una pareja portadora asintomática, con la posibilidad de tener una infección latente o poco manifiesta. Esto justifica plenamente la evaluación periódica de pacientes que hayan padecido infertilidad por factor infeccioso, considerando el ulterior riesgo de desarrollar cáncer cérvico uterino.

Tampoco deberá perderse de vista la importancia de dar seguimiento clínico a las mujeres que logren el embarazo durante la gestación y al término de ésta, incluir al recién nacido, una vez que se ha demostrado que existe la transmisión *in útero*, madre a hijo (Rintala *et al.*, 2005; Castellsagué *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2013; Koskimaa *et al.*, 2014).

Los estudios acerca de una posible asociación entre la presencia de infección por VPH con la disminución de la fertilidad en el hombre se han enfatizado recientemente (Gizzo *et al.*, 2014; Souho *et al.*, 2015), sin embargo las primeras evidencias surgieron de estudios realizados en la década de los 90. Chan P.J. y su grupo de colaboradores demostraron en 1994, la presencia de secuencias de ADN correspondientes al VPH en espermatozoides “lavados” durante el proceso de capacitación; éste mismo grupo de investigadores aportaron evidencias de la transferencia del VPH del espermatozoide a la cavidad uterina y al embrión (Chan *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1996), mientras que Lai y cols., describieron la presencia de ADN en el plasma seminal y espermatozoides y su efecto sobre la motilidad del espermática (Lai *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997). Unos años después se comprobó a nivel experimental daño cromosómico en espermatozoides infectados con VPH, dependiente del genotipo: los VPH 16 y 31 (Connely *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). Estudios epidemiológicos han referido que el VPH es más frecuente en hombres infértiles con leucocitospermia que en hombres fértiles sanos y estudios de casos y controles han demostrado que la viabilidad, la

movilidad, la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide y su morfología se ven afectadas en la infección seminal por VPH (Foresta *et al.*, 2010; Garolla *et al.*, 20013; Yang *et al.*, 2013).

En la mujer, el daño que la infección por VPH produce en el cérvix, se asocia a la falta de fertilidad, así se deduce del estudio de van Hamont *et al.* en 2006 en mujeres a las que se les indicó fertilización *in vitro*, presentaban lesiones cervicales de mayor grado en un porcentaje dos veces superior que en la población general. Por otra parte, una asociación significativa se ha encontrado entre la presencia de infecciones cervicales por VPH de alto riesgo y la ruptura prematura de membranas (Cho *et al.*, 2013). Algunas otras evidencias de que la infección placentaria por VPH está presente en la ruptura de membranas fetales de abortos espontáneos y productos nacidos antes de término han sido descritas por otros autores, pero falta evidencia que aclare si la asociación es dependiente del genotipo (Gómez *et al.*, 2008; Skoczynski *et al.*, 2011). Aunque el objetivo principal del presente trabajo no está enfocado a investigar la relación entre aborto e infección por VPH, en nuestro estudio 28 mujeres refirieron el antecedente de aborto espontáneo, el 50% tenían VPH 6, el 21,4% fueron positivas para VPH 11, el 17,8% para el VPH 68, el 14,2% para el VPH 62 y el 10,7% fueron positivas por igual para los genotipos 31,16 y 18. De las 28 pacientes con antecedente de aborto, 10 refirieron 3 o 4 pérdidas gestacionales consecutivas y 6 de ellas tenían infección por VPH, siendo el genotipo 6 de bajo riesgo para cáncer el más frecuente, pero predominando en general diferentes genotipos de alto riesgo: 16, 18, 51, 52, 66, 68 y variantes de rara frecuencia: 61,71 y 81.

Siendo la fertilización *in vitro* un recurso que intenta resolver entre otras circunstancias adversas, los daños cervicales en la infección por VPH, y conociendo que el VPH se adhiere al segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (Perez-Andino *et al.*, 2009), algunas investigaciones han estimado el efecto de la infección por VPH en el éxito de la reproducción asistida, encontrando un 40% de fracaso de la fertilización *in vitro* en mujeres con infección por VPH contra 13,5% en mujeres sin infección, diferencia estadísticamente significativa (Perino *et al.*, 2011); Por igual otros autores describieron un porcentaje mayor de fracaso en reproducción asistida en mujeres con VPH: 76,5% vs.57% en

mujeres sin la infección estimando para ésta diferencia un valor de $p=0,02$ (Spandorfer *et al.*, 2006).

Hasta el momento no hay evidencias de que el genotipo de VPH determine o no su efecto nocivo en la fertilización *in vitro*. En este estudio los genotipos, 6, 11 y 18 fueron los de mayor prevalencia en el 47% de las 38 mujeres que fueron tratadas por inseminaciones, fertilización asistida e ICSI. La tasa de éxito por inseminación intrauterina fue de 2,7% y de 11,6% en los procedimientos de FIV/ICSI, pero en ninguno de los casos los embarazos llegaron más allá de la cuarta semana de gestación.

En los últimos estudios se han aportado más evidencias que señalan la importancia nociva de la infección por VPH sobre el embarazo y en la generación de sus complicaciones, pero el efecto de esta infección viral sobre la fertilidad no se ha establecido aún con claridad.

La presencia de VPH en más de la mitad de las mujeres con infertilidad, aborto y/o fracaso de tratamientos de reproducción asistida estudiadas en esta tesis, pudiera deberse a que la infección viral coincidió con otras infecciones de los órganos del aparato reproductor causadas por gérmenes de transmisión sexual; en investigaciones previas, hemos encontrado en la población que se atiende en clínicas de reproducción del noreste mexicano una alta frecuencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* y el *Ureaplasma urealyticum*, pero hasta ahora hemos podido obtener datos de la presencia de VPH y la distribución de los genotipos en estos pacientes. Será necesario realizar estudios de grupos más numerosos y controlados, en lo posible, a fin de obtener resultados más concluyentes en cuanto a la importancia del VPH en el fallo reproductivo y el impacto que tuviera su asociación con otros gérmenes comúnmente asociados a infecciones genitales.

En trabajos que realizamos con anterioridad en grupos de pacientes infértiles, comprobamos que los procesos inflamatorios que cursan con producción de radicales libres y oxígeno reactivo que, entre otros daños celulares, ocasionan mutaciones y fragmentación de la cromatina nuclear del espermatozoide (Gallegos *et al.*, 2008; Gallegos Ávila *et al.*, 2011a; Gallegos Ávila *et al.*, 2011b); seguramente estas alteraciones serán más acentuadas en las infecciones multimicrobianas, sobre todo las que incluyan microorganismos intracelulares como clamidias y micoplasmas. Si, además, consideramos el potencial

carcinogénico del VPH *per se*, podría sugerirse el empleo de pruebas de detección y genotipificación de VPH ante la presencia de trastornos reproductivos relacionados con factor infeccioso con presencia de gérmenes de transmisión sexual, por el potencial carcinogénico que suponen estas asociaciones microbianas.

Aunque otros estudios han demostrado que existe una asociación entre la infección por *Chlamydia trachomatis* y la persistencia de VPH de alto riesgo (Samoff *et al.*, 2005; Silins *et al.*, 2005), en ésta investigación no se logró establecer una asociación entre esos gérmenes, pero sí se encontró una elevada prevalencia (51,1%) de VPH en las mujeres con infección persistente por *Chlamydia trachomatis*. Este dato coincide con las observaciones de Seraceni *et al.*, del 2014, hechas a partir de un estudio en mujeres jóvenes con riesgo para clamidia pero sin lesiones intraepiteliales ni cáncer, en quienes encontró 60,4% de infección por VPH en los casos de infección persistente por *C. trachomatis*, así como múltiples genotipos de VPH en el 62,5% de los casos positivos para el virus (Seraceni *et al.*, 2014). En el grupo de muestras cérvico vaginales incluidas en esta investigación, el 68% de los casos con *Chlamydia trachomatis* y VPH positivo, contenían varios genotipos de VPH oncogénicos. Con ésta base pudiéramos sugerir que el tratamiento oportuno y exhaustivo de la infección genital por esta *Chlamydia trachomatis* tendría posibles implicaciones en la prevención del cáncer cervical.

Por otra parte, podemos insistir en resaltar que éste es el primer trabajo en el que se refiere la asociación de *Ureaplasma urealyticum* con el VPH en pacientes con fallo reproductivo, en grado estadísticamente significativo ($p=0,05$). Esta observación resulta relevante ante el efecto cooperador entre *Ureaplasma urealyticum* y VPH en su importancia carcinogénica, que ha sido ya mencionado (Lukic *et al.*, 2006; Biernat-Sudolska *et al.*, 2011).

De acuerdo al análisis estadístico de los datos obtenidos en este tipo de pacientes el 79,5% de los casos positivos para VPH, presentaban uno o más genotipos de VPH de alto riesgo para cáncer cervical. Si se toma en cuenta la combinación frecuente de *C. trachomatis* y *U. urealyticum* con VPH, tres microorganismos con potencial carcinogénico, podemos insistir en que éstos pacientes deberían considerarse como un grupo que necesita

vigilancia periódica y darle un valor preventivo para el cáncer, al tratamiento de las infecciones.

De acuerdo a los resultados de esta tesis, entre los grupos de riesgo para ETS deberá considerarse al grupo de parejas con problemas de fertilidad. A pesar de que deba seguir estudiándose su significado clínico y mecanismos de patogenicidad, en la medida de lo posible, mediante estudios controlados, en este grupo poblacional la tríada VPH/*Ureaplasma*/*Chlamydia* (VPH/Uu/Cht) podría considerarse como una condición potencialmente causante del cáncer de cérvix uterino.

Organismos internacionales recomiendan que cuando existen condiciones que establezcan que el riesgo de desarrollar cáncer es elevado, la citología se realice cada año durante toda la vida, y que en esos casos la prueba de VPH puede reemplazar a la citología. Se considera que existe un riesgo alto para cáncer cervical, en el caso de mujeres con infección por HIV, mujeres que han recibido un órgano trasplantado (Kaplan *et al.*, 2009). El grupo de pacientes con otras ETS no se han incluido en esta recomendación.

Algunos investigadores fundamentados en un estudio prospectivo de 5 a 7 años en Costa Rica, demostraron un aumento del riesgo de reinfección y una tendencia a la persistencia de VPH en mujeres de mediana edad, justificando que la realización de la citología cérvico vaginal y la investigación de VPH se extienda a población de esa edad (Castle *et al.*, 2005). A éste grupo de edad pertenecieron las pacientes de éste estudio con fallo reproductivo e infección multimicrobiana que incluye VPH.

Actualmente, la guías internacionales no consideran dentro del grupo de riesgo para realización de citología cérvico vaginal ni investigación de VPH a las mujeres con infección genital por *Chlamydia trachomatis*, a pesar de su conocido efecto favorecedor de carcinogénesis y de la persistencia de la infección por VPH (Samoff *et al.*, 2005; Silins *et al.*, 2005). Este hecho pudiera cuestionarse ya que tratándose de un germen de transmisión sexual, su presencia pudiera sugerir la coinfección o la presencia de infecciones multimicrobianas, entre las que el VPH puede encontrarse, sobre todo teniendo en cuenta que se trata de los gérmenes de transmisión sexual de mayor prevalencia a nivel mundial.

En el caso del *Ureaplasma urealyticum*, se ha asociado mayormente a infertilidad, daño, espermático y en la práctica médica no especializada, es poco común que se investigue y para muchos clínicos es un germen de poca importancia. Quizá esto se vea influenciado por que se ha considerado parte de la flora normal de la uretra y porque los medios de cultivo selectivos no forman parte de las pruebas disponibles en laboratorios comerciales.

En esta situación del ejercicio de la medicina y ante la falta de recursos suficientes, la búsqueda se dirige solo a detectar el ADN del VPH o la genotipificación exclusiva de VPH de riesgo alto para cáncer con omisión de genotipos de bajo riesgo. Nuestros resultados nos permiten sugerir que en los pacientes con fallo reproductivo, la detección de VPH de riesgo bajo no debiera omitirse. Al menos por su frecuencia de presentación, la genotipificación de los tipos 6 y 11 debería de reconsiderarse. Además de que aún no está establecido si representan un factor en contra de la fecundación o implantación embrionaria, por el riesgo de transmisión a la descendencia, demostrada por autores referidos ya en párrafos anteriores y el potencial de carcinogénesis en la orofaringe del infante.

Con la información generada por éste estudio, debemos incidir en la importancia de la educación sexual, sobre todo en jóvenes.

La vacunación contra el VPH, la circuncisión, el uso del preservativo, la práctica de una correcta higiene genital son normas básicas de salud que se muestran eficaces en la prevención de enfermedades de transmisión sexual y del cáncer de cérvix. Así mismo, ayudarían a la disminución de la incidencia de problemas de salud reproductiva, complicaciones obstétricas y perinatales.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. En la serie estudiada de 104 mujeres subfértiles con infección genitourinaria, la prevalencia de Virus del Papiloma Humano fue del 49%.

SEGUNDA. En asociación con la PCR positiva para VPH se encontraron los antecedentes de proceso inflamatorio inespecífico en el PAP, de fallo en tratamientos de reproducción asistida y de infección previa por VPH. Signos y síntomas de infección genitourinaria activa, y secreción blanca mucoide densa en el fondo de saco vaginal también se observaron en asociación a la detección del VPH.

TERCERA. El 84,6% de las pacientes, tenían una infección genital multimicrobiana. *Chlamydia trachomatis*, fue la bacteria encontrada con mayor frecuencia, pero su identificación en este estudio, no se asoció con la presencia de infección por VPH. En cultivos positivos para *Ureaplasma urealyticum* se aisló también el VPH, esta asociación fue estadísticamente significativa, al igual que el estado de la microbiota vaginal que presentó una relación inversa con la presencia del VPH.

CUARTA. En este grupo de mujeres los genotipos de VPH más frecuentes fueron: el 6, el 18, el 16, el 58, el 52, el 11 y el 68. En el 60% de los casos positivos para VPH, se identificaron 2 o más genotipos. Las combinaciones más frecuentes formadas por genotipos de VPH de alto riesgo fueron 16 y 18; 16 y 58; 16 y 33; 16 y 52 y la del 18 con el 58. Considerando los casos de presentación aislada y combinada de VPH de alto riesgo, el 79,5% del grupo con VPH, tendrían un riesgo potencial de padecer un cáncer cérvico uterino. Basados en éstos datos pudiera considerarse a las mujeres con fallo reproductivo e infección genital, como grupo de riesgo para cáncer cervical.

7. RESUMEN

Ante la escasa información existente en la bibliografía revisada sobre la importancia del VPH asociada con otros gérmenes, en parejas con infertilidad, llevamos a cabo un estudio en 104 mujeres seleccionadas de forma aleatoria, que se atendieron por fallo reproductivo e infecciones genitales internas. Cada paciente, autorizó por escrito el uso de la información de su expediente clínico con fines estadísticos, se obtuvieron datos de parámetros clínicos y microbiológicos seleccionados incluyendo los resultados de PCR para ADN del VPH, IFD para *C. trachomatis*, cultivo en medios selectivos para *U. urealyticum*, *M. hominis* y cultivo general. A partir de la base de datos generada se realizó un análisis estadístico para determinar la posible asociación entre los diferentes genotipos investigados VPH investigados frente a parámetros clínicos de infección genital, antecedentes de tratamientos de reproducción asistida y sus resultados además de antecedentes de pérdida gestacional.

La prueba de PCR fue positiva en 51 mujeres (49%) incluidas en éste estudio. Se identificaron 90 casos (86,5%) con *Chlamydia trachomatis*, 49 con *Ureaplasma urealyticum* (47,11%) y 37 con *Mycoplasma hominis* (35,57%). Por cultivo general se aislaron en orden de frecuencia: *Escherichia coli* (20,2%), *Cándida albicans* (17,3%) y *Enterococcus faecalis* (10,6%) además se observó que en la mayoría de las muestras la microbiota vaginal estaba ausente (52,9%) o disminuida (24%). El 84,6% de las pacientes, tenían una infección genital multimicrobiana y en el 15,4% se identificó solo un germen: *C. albicans* en 15 pacientes y en una de las muestras se aisló VPH como único. El análisis estadístico mostró que la positividad de la prueba de VPH se asoció con la presencia de *Ureaplasma urealyticum* ($p=0,05$) y el deterioro de la microbiota vaginal ($p=0,001$). La distribución de *C. trachomatis* fue similar en los dos grupos VPH positivo y VPH negativo.

De los datos clínicos analizados en el momento del estudio, se asociaron con VPH positivo: la presencia de infección genitourinaria activa ($p=0,01$), el antecedente de más de dos parejas sexuales ($p=0,05$), el antecedente de haber tenido infección por VPH ($p\leq 0,0001$); el antecedente de tratamientos de reproducción asistida que no resolvieron el problema de fertilidad y la presencia de secreción mucoide densa de color blanco en el fondo de saco de la vagina procedente del conducto cervical, al momento de la exploración ($p=0,05$).

En esta investigación se encontraron como genotipos de VPH de mayor prevalencia, el 6 (19,2%), 18, (12,5%), 16 (11,5%), 58 (7,2%), 52 (6,7%), 11 (6,7%) y el 68 (7,5%). En el 40% se identificó solo una variante genotípica del VPH y en el 60% 2 o más combinaciones de las cuales 46,3%, fueron entre genotipos de alto riesgo: 16 y 18, 18 y 58, 16 y 33, 16 y 52 y 18 y 52. En el 44,8%, se presentaron combinaciones de VPH de bajo y alto riesgo: el VPH 6 se presentó en casos que fueron positivos para los VPH 18, 52, 16 y 39, mientras que el VPH 11 se asoció con el 16. El 23,5% del grupo VPH positivas, presentaban de tres a 5 genotipos diferentes.

En suma, 79,5% de las pacientes positivas para VPH, presentaban uno o más genotipos de VPH de alto riesgo para cáncer cervical. Este dato, aunado a la asociación observada entre la positividad para el VPH y el antecedente de haber tenido tiempo atrás infección por mismo microorganismo, implica la persistencia o la reinfección por VPH y sustenta la recomendación de que las mujeres con fallo reproductivo sean incluidas como grupo de riesgo para cáncer cervical.

En el caso de las 28 mujeres que habían tenido de 1 a 4 pérdidas gestacionales al estudiar la posible asociación con la presencia del VPH en este estudio no se pudo confirmar dicha relación. Para futuros estudios en los que se incluyan mayor número de casos, creemos importante mencionar que dos de los tres genotipos más prevalentes encontrados en éstos grupos de pacientes, fueron el 6 y el 11 considerados de bajo riesgo para cáncer cervical, pero cuya relevancia en el resultado de las inseminaciones, fertilización *in vitro* y pérdida gestacional está aún por definirse.

8. SUMMARY

There are not enough evidences over the significance of VPH genital infection on reproductive failure. Some authors recently considered that beside the oncogenic capacity, VPH could have an etiological roll on interrupted pregnancy, but more evidence is necessary to confirm this affirmation.

This is a study carried out by aleatory selection of 104 infertile women attended by reproductive failure and genital infection; the main objective was to stablish the relationship of VPH presence, with other microorganism and the genotype of VPH detected in this group of infertile women. All patients authorized the use of clinic and laboratory analysis data from her cervical and vaginal samples, to realize statistical analysis and sign an informed consent.

The clinical parameters considered were: signs and symptoms of infection disease, results of previous assisted reproduction treatments, and the presence of previous abortions. These data were compared to genotype VPH present, and the diagnosis of others germs by laboratory test included direct investigation with immunofluorescence monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*, and bacterial cultures, included selective media to *U. urealyticum*, *M. hominis*.

The microorganism identified on the group studied are: *C. trachomatis* (86.5%), VPH (49%), *U. urealyticum* (47.11%), *M. Hominis* (35.57%), *E. coli* (20.2%), *C. Albicans* (17.3%) and *S. faecalis* (10.6%). In a high proportion of the vaginal samples microbiota vaginal was reduced or absent in a (76.9%) and 86% have more than one pathogen germs. *C albicans* was present like solitary microorganism in 17.3% as well VPH was the only identified germ in one patient. Statistical analysis stablished positive correlation between VPH and *U. urealyticum* ($p=0.05$), and decreased microbiota ($p=0.001$). The distribution of *C. trachomatis* was similar in the positive and negative to VPH group.

In this study, more than one sexual partner ($p=0.05$), genitourinary infection symptoms ($p=0.01$), white mucous vaginal secretion fluxing from the uterine duct ($p=0.05$), failure in assisted reproduction before carry out, and previously VPH infection diagnosed by suspicious lesion or cytological exam ($p\leq 0.0001$) were in association to VPH.

Prevalent genotypes of VPH detected in the infertile patients studied group were; VPH 6 (19.2%), VPH 18 (12.5%), VPH 16 (11.5%), VPH 58 (7.2%), VPH 52 (6.7%), VPH 11 (6.7%) and VPH 68 (7.5%). Combinations of more than one VPH genotypes were detected in 60% on the studied samples. From them 46.3% were the following associations between high risk for cancer VPH: 16/18, 18/58, 16/33, 16/52 and 18/52. In a similar percentage (44.8%) of women, low risk for cancer, principally VPH 6, was detected in combination with high risk VPH: 18, 52, 16 and 39. As well we observed that three to five different VPH genotypes were present in 23.5% of the positive group infertile patients.

According to the results of this study, a total of 79.5% of positive VPH group of patients, presented one or more high risk genotypes, and considering the statistical association between the positivity to VPH and the clinical history of previous VPH infections, this condition may be represent a persistent infection or a reinfection. Consequently, we consider convenient a recommendation to take in account women with reproductive failure, like a group of risk of cervical cancer.

With the results obtained from this study, was not possible to stablish an association between the abortions presented on 28 of the studied women, and the positivity to VPH. Nevertheless for future studies that include a high number of patients, is may be important to observe that low risk to cancer genotypes 6 and 11, were present in a high prevalence in this investigation, and their importance on the results of inseminations, in vitro fertilization and gestational loss, is not defined now a days.

9. REFERENCIAS

- Agrawal T, Vats V, Salhan S, Mittal A.** Determination of chlamydial load and immune parameters in asymptomatic, symptomatic and infertile women. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009;55:250-7.
- Alberts CJ, Schim van der Loeff MF, Papenfuss MR, da Silva RJ, Villa LL, et al.** Association of Chlamydia trachomatis infection and herpes simplex virus type 2 serostatus with genital human papillomavirus infection in men: the HPV in men study. *Sex Transm Dis* 2013;40:508-15.
- Alfaro Castro A, Fournier Pérez M.** Virus Del Papiloma Humano. *Rev Med Cos Cen* 2013;70:211-7.
- Amador-Molina A, Hernandez-Valencia JF, Lamoyi E, Contrera-Paredes A, Lizano M.** Role of innate immunity against Human Papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. *Viruses* 2013;5:2624-42.
- Anagrius C, Loré B, Jensen JS.** *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sex Transm Infect* 2005; 81:458-62.
- Anciaux D, Lawrence WD, Gregoire L.** Glandular lesions of the uterine cervix: prognostic implications of human papillomavirus status. *Int J Gynecol Pathol* 1997;16:103-10.
- Anttila T, Tenkanen L, Lumme S, Leinonen M, Gislefoss RE, Hallmans G, et al.** Chlamydial antibodies and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:385-9.
- Ault KA.** Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2006;(Suppl):40470.
- Bachir BG, Jarvi K.** Infectious, inflammatory, and immunologic conditions resulting in male infertility. *Urol Clin North Am* 2014;41:67-81.
- Baczynska A, Funch P, Fedder J, Knudsen HJ, Birkelund S, Christiansen G.** Morphology of human fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis*--in vitro organ culture study. *Hum Reprod* 2007;22:968-79.
- Bandyopadhyay S, Austin RM, Dabbs D, Zhao C.** Adjunctive human papillomavirus DNA testing is a useful option in some clinical settings for disease risk assessment and triage of females with ASC-H Papanicolaou test results. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1874-81.
- Banks L, Pim D, Thomas M.** Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12:877-86.
- Bébéar C, De Barbeyrac B.** Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:4-10.
- Bennani B, Bennis S, Nejjari C, Ouafik L, Melhouf MA, El-Rhazi K, Riffi AA.** Correlates of HPV: A cross-sectional study in women with normal cytology in north-central Morocco. *J Infet Dev Ctries* 2012;6:543-50.
- Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ.** Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertil Steril* 2007;87:1087-97.
- Biernat-Sudolska M, Szostek S, Rojek-Zakrzewska D, Klimek M, Kosz-Vnenchak M.** Concomitant infections with human papillomavirus and various mycoplasma and ureaplasma species in women with abnormal cervical cytology. *Adv Med Sci* 2011;56:299-303.
- Black CM.** Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:160-84.
- Blanchard A, Hentchel J, Duffy L, Baldus K.** Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract on newborns. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl.1):S148-53.
- Bodily J, Laimins LA.** Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 2011;19:33-9.
- Borovkova N, Korrovits P, Ausmees K, Türk S, Jöers K, Punab M, Mändar R.** Influence of sexual intercourse on genital tract microbiota in infertile couples. *Anaerobe* 2011;17:414-8.
- Bradford LL, Ravel J, Bruno V.** Understanding

- vulvovaginal candidiasis through a community genomics approach. *Curr Fungal Infect Rep* 2013;7:126-31.
- Bravo I, Félez-Sánchez M.** Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Health* 2015;2015: 32-51.
- Brunham RC, Maclean IW, Binns B, Peeling RW.** Chlamydia trachomatis: its role in tubal infertility. *J Infect Dis* 1985;152: 1275-82.
- Buck C, Day PM, Trus BL.** The Papillomavirus Major Capsid Protein L1. *Virology* 2013;445: 169-74.
- Bulk S, Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L, Boeke AJ, Verheijen RH, Snijders PJ, Meijer CJ.** Risk of high-grade cervical intra-epithelial neoplasia based on cytology and high-risk HPV testing at baseline and at 6-months. *Int J Cancer* 2007;121:361-7.
- Busolo F, Zanchetta R, Bertolini G.** Mycoplasmic localization patterns on spermatozoa from infertile men. *Fertil Steril* 1984;42:412-7.
- Cardoso JC, Calonje E.** Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: A review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 2011;20:145-54.
- Carreras-Collado R, Xercavins-Montosa J, Checa-Vizcaíno MA.** Epidemiología de la infección por VPH y del cáncer de cuello de útero. Nuevas opciones preventivas. En: Virus del papiloma humano y cáncer de cuello uterino. Carreras Collado R, et al., eds. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana. 2007. pp:1-25.
- Cassel GH, Waites KB, Watson HL, Crouse KT, Harasawa R.** Ureaplasma urealyticum intrauterine infection: Role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:69-87.
- Castellsagué X, Drudis T, Cañadas MP, Goncá A, Ros R, Pérez JM, et al.** Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infect Dis* 2009;9:74.
- Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al.** A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005;191:1808-16.
- Cates W Jr.** Gallagher lecture. Teenagers and sexual risk taking: the best of times and the worst of times. *J Adolesc Health* 1991;12:84-94.
- Centers for Disease Control and Prevention, CDC.** Genital HPV infection - Center of Disease Control fact sheet, 2014.
- Centers for Disease Control and Prevention, Health Services Research Division.** Sexually Transmitted Disease Surveillance. 2007; 2008; 2010; 2012. <http://www.cdc.gov/std/stats07/corrections.html>
- Centers for Disease Control and Prevention-Division of Cancer Prevention and Control.** Cervical Cancer Screening Guidelines for Average-Risk Women. 2012.
- Chan PJ, Seraj IM, Kalugdan TH, King A.** Evidence for case of transmission of human papillomavirus DNA from sperm to cells of the uterus and embryo. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:516-9.
- Chan PJ, Su BC, Kalugdan T, Seraj IM, Tredway DR, King A.** Human papillomavirus gene sequences in washed human sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil Steril* 1994;61: 982-5.
- Chang-Claude J, Schneider A, Smith E, Blettner M, Wahrendorf J, Turek L.** Longitudinal study of the effects of pregnancy and other factors on detection of HPV. *Gynecol Oncol* 1996;60:355-62.
- Chávez-Briones ML, Alvarez-Cuevas S, Ramos-González B, Casillas-Vega N, Niderhauser-García A, Ancer-Rodríguez J, Hardisson-Hernández D, Gallegos-Ávila MG.** Endometritis por Chlamydia trachomatis y Ureaplasma urealyticum en mujeres con infertilidad y aborto. *Medicina Universitaria* 2013;5(Supl 1):1-124.
- Cherpes TL, Marrazzo JM, Cosentino LA, Meyn, LA, Murray PJ, Hillier SL.** Hormonal contraceptive use modulates the local

- inflammatory response to bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect* 2008;84:57-61.
- Cho G, Min KJ, Hong HR, Kim S, Hong JH, Lee JK, Oh MJ, Kim H.** High-risk human papillomavirus infection is associated with premature rupture of membranes. *BMC Pregnancy Childbirth* 2013;13:173.
- Cohen CR, Manhart LE, Bukusi EA, Astete S, Brunham RC, Holmes KK, et al.** Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. *Lancet* 2002;359:765-6.
- Conde-Ferrández L, Chan-May Ade A, Carrillo-Martínez JR, Ayora-Talavera G, González-Losa MR.** Human papillomavirus infection and spontaneous abortion: a case-control study performed in Mexico. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;170:468-73.
- Connelly DA, Chan PJ, Patton WC, King A.** Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1068-70.
- Cubie HA.** Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* 2013;445:21-34.
- Cunningham KA, Beagley KW.** Male genital tract chlamydia infection: Implications for pathology and infertility. *Biol Reprod* 2008;79:180-9.
- Cuschieri KS, Cubie HA.** The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *J Clin Virol* 2005;32 Suppl 1:S34-42.
- de Luca G, Marin M, Schelover E, Chamorro E, Vicente L, Alhom M, Alonso JM.** Infección por *Chlamydia trachomatis* y Papilomavirus en mujeres con alteraciones citohistológicas de cuello uterino. *Medicina (B Aires)* 2006;66:303-6.
- de Lucena-Oliveira M, de Amorim MM, de Souza AS, de Albuquerque LC, da Costa AA.** Chlamydia infection in patients with and without cervical intraepithelial lesions. *Rev Assoc Med Bras* 2008;54:506-12.
- de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX.** Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:453-9.
- de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al; Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group.** Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010;11:1048-56.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H.** Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
- de Vuyst H, Clifford G, Li N, Franceschi S.** HPV infection in Europe. *Eur J Cancer* 2009;45:2632-9.
- Denks K, Spaeth EL, Jöers K, Randoja R, Talpsep T, Ustav M, Kurg R.** Coinfection of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and human papillomavirus among patients attending STD clinics in Estonia. *Scand J Infect Dis* 2007;39:714-8.
- Díaz-Gutiérrez OG, Gallegos de Lerma MG.** Características de estructura fina de *Mycoplasma* sp. en semen humano. *Enf infec microbiol* 1996;5.
- Diquelou JY, Pastorini E, Feneux D, Gicquel JM.** The role of *Chlamydia trachomatis* in producing abnormal movements by spermatozoa. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1989;18:615-25.
- Doorbar J.** The E4 proteins: structure, function and patterns of expression. *Virology* 2013;445:80-98.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA.** The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;20;30 Suppl 5:F55-70.
- Dunne EF, Park IU.** HPV and HPV-associated diseases. *Infect Dis Clin North Am* 2013;27:765-78.
- Eckert LO, Lentz GM.** Infections of the lower genital tract: Vulva, vagina, cervix, toxic shock syndrome, HIV infections. In: Comprehensive Gynecology. 5th ed. Katz VL, Lentz GM, Lobo RA, Gershenson DM (eds.). Philadelphia, Pa:

Mosby Elsevier, 2007. chap 22.

Elkharashy MS, Mohamed NGR, Hanafi NF, Orief YI, El Sabaa BM. Prevalence of high risk human papillomavirus types 16/18 in cytologically abnormal cervical smears in Alexandria, Egypt. A cytological and molecular study. *Middle East Fertil Soc J* 2013;18:253-67.

Ellenson LH, Pirog EC. Robbins y Cotran. Neoplasias premalignas y malignas del cuello uterino. En: Patología Estructural y Funcional. 9ª ed. Kumar V, Abbas AK, Aster JC (Eds.). Chicago: Elsevier, 2015.pp:993-1004.

Equils O, Lu D, Gatter M, Witkin SS, Bertolotto C, Arditi M, et al. Chlamydia heat shock protein 60 induces trophoblast apoptosis through TLR4. *J Immunol* 2006;177:1257-63.

European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe. (2008). http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0812_SUR_Annual_Epidemiological_Report_2008.pdf

Evans C, Das C, Kinghorn G. A retrospective study of recurrent chlamydia infection in men and women: is there a role for targeted screening for those at risk? *Int J STD AIDS* 2009;20:188-92.

Faro S. Chlamydia trachomatis: female pelvic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1767-70.

Filipp E, Niemiec KT, Kowalska B, Pawloska A, Kwiatkowska M. Chlamydia trachomatis infection in sexually active teenagers. *Ginekol Pol* 2008;79:264-70.

Fleming DT, Wasserheit JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: The contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect* 1999;75:3-17.

Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, Pizzol D, Moretti A, Barzon L, Palù G. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril* 2010;93:802-6.

Foresta C, Noventa M, De Toni L, Gizzo S, Garolla A. HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systematic literature review to a possible clinical management proposal. *Andrology* 2015;3:163-73.

Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine* 2012;30 (Suppl 5):F12-23.

Fowlkes DM, Doohar GB, Oleary WM. Evidence by scanning electron microscopy for an association between spermatozoa and T-mycoplasmas in men of infertile marriage. *Fertil Steril* 1975;26:1203-11.

Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999;180:1415-23.

Freitas A, Mariz F, Silva A, Jesus A. Human papillomavirus vertical transmission: review of current data. *Clin Infect Dis* 2013;56:1451-6.

Gall SA. Virus del Papiloma Humano. En: Enfermedades Infecciosas en la Mujer. Faro S, Soper DE (eds.). México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. 2002. pp:504-24.

Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosalvez J, Fernandez JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril* 2008;90: 328-34.

Gallegos-Avila G. Infecciones por Chlamydia trachomatis y Mycoplasma sp. Su relación con la infertilidad masculina. *Bol Col Mex Urol* 2003;18:106-12.

Gallegos-Ávila G, Alvarez-Cuevas S, Niderhauser-García A, Ancer-Rodríguez J, Jaramillo-Rangel G, Ortega-Martínez M. Phagocytosis of spermatozoa and leucocytes by epithelial cells of the genital tract in infertile men infected with Chlamydia trachomatis and mycoplasmas. *Histopathology* 2009a;55:232-4.

Gallegos-Ávila MG, Álvarez-Cuevas S, Sánchez-Hernández JJ, Niderhauser-García A,

- Casillas-Vega N, Ramos-González B.** Resultado del tratamiento del binomio Andro-Ginecológico en la infertilidad conyugal por infección genital interna. *Andrology* 2013; 11:1-14.
- Gallegos-Avila G, Ortega-Martínez M, Ramos-González B, Tijerina-Menchaca R, Ancer-Rodríguez J, Jaramillo-Rangel G.** Ultrastructural findings in semen samples of infertile men infected with *Chlamydia trachomatis* and mycoplasmas. *Fertil Steril* 2009b;91:915-9.
- Gallegos Ávila MG, Ramos González B, Sánchez Hernández JJ, Niderhauser García A, Ancer Rodríguez J.** Aplicación del NBT-Test para evaluar la producción espermática de ROS en la infección seminal por *C. trachomatis* y su asociación con la fragmentación de la cromatina y el deterioro de la calidad espermática. *Rev Int Androl* 2011a;9:88.
- Gallegos Ávila MG, Ramos González B, Sánchez Hernández JJ, Niderhauser García A, Ancer Rodríguez J.** Disminución de la teratozoospermia secundaria a tratamiento antibiótico en pacientes infértiles con infección urogenital ocasionada por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* *Rev Int Androl* 2011b;9:90.
- Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, De Toni L, Barzon L, Foresta C.** Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertil Steril* 2013;99:125-31.
- Gaudoin M, Rekha P, Morris A, Lynch J, Acharya U.** Bacterial vaginosis and past chlamydial infection are strongly and independently associated with tubal infertility but do not affect in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril* 1999;72:730-2.
- Gaydos C, Hardick J.** Point of care diagnostics for sexually transmitted infections: perspectives and advances. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014;12:657-72.
- Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, Chakroun N, Sellemi A, Znazen A, Hammami A.** Assessment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, and *Mycoplasma genitalium* in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl* 2008;29:198-206.
- Ghittoni R, Accardi R, Chiocca S, Tommasino M.** Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedicalscience* 2015; 9:526.
- Giannini S, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P.** Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer* 2002;97:654-9.
- Gillison ML, Castellsagué X, Chaturvedi A, Goodman MT, Snijders P, Tommasino M, Arbyn M, Franceschi S.** Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. *Int J Cancer* 2014;134:497-507.
- Gizzo S, Ferrari B, Noventa M, Ferrari E, Patrelli TS, Gangemi M, Nardelli GB.** Male and couple fertility impairment due to HPV-DNA sperm infection: Update on molecular mechanism and clinical impact—Systematic review. *Biomed Res Int* 2014;2014:230263;1-12.
- Gnarpe H, Friberg J.** T-mycoplasmas as a possible cause for reproductive failure. *Nature* 1973;242:120-1.
- Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW.** Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-7.
- Gomez LM, Ma Y, Ho C, McGrath CM, Nelson DB, Parry S.** Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. *Hum Reprod* 2008;23:709-15.
- Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R.** Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8:3-13.
- Gonzales GF, Muñoz G, Sánchez R, Henkel R, Gallegos-Avila G, Díaz-Gutierrez O, Vigil P, Vásquez F, Kortebani G, Mazzolli A, Bustos-Obregón E.** Update on the impact of *Chlamydia trachomatis* infection on male fertility. *Andrologia* 2004;36:1-23.

- Grande G, Milardi D, Vincenzoni F, Pompa G, Biscione A, Astorri AL, *et al.* Proteomic characterization of the qualitative and quantitative differences in cervical mucus composition during the menstrual cycle. *Mol Biosyst* 2015;11:1717-25.
- Grossgebauer K, Hennig A. Ureaplasma-infected human sperm in infertile men. *Arch Androl* 1984;12 Suppl:35-41.
- Haedicke J, Iftner T. Human papillomaviruses and cancer. *Radiother Oncol* 2013;108:397-402.
- Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, Xu F, Ness RB. Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women. *J Infect Dis* 2010;201 Suppl 2:S134-55.
- Handisurya A, Day PM, Thompson CD, Buck CB, Kwak K, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Murine skin and vaginal mucosa are similarly susceptible to infection by pseudovirions of different papillomavirus classifications and species. *Virology* 2012;433:385-94.
- Hebb JK, Cohen CR, Astete SG, Bukusi EA, Totten PA. Detection of novel organisms associated with salpingitis, by use of 16S rDNA polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 2004;190:2109-20.
- Hermonat PL, Han L, Wendel PJ, Quirk JG, Stern S, Lowery CL, Rechtin TM. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes* 1997;14:13-7.
- Hernández-Girón C, Smith JS, Lorincz A, Lazcano E, Hernández-Avila M, Salmerón J. High-risk human papillomavirus detection and related risk factors among pregnant and nonpregnant women in Mexico. *Sex Transm Dis* 2005;32:613-8.
- Hillier SL, Marazzo JM, Holmes KK. Bacterial vaginosis. In: Sexually Transmitted Diseases. Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA, *et al.*, (eds.). New York, NY: McGraw-Hill. 2008.
- Ilkit M, Guzel AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Crit Rev Microbiol* 2011;37:250-61.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). <http://www.inegi.org.mx> Consultado el 2 de junio del 2015.
- Joesoef MR, Weinstock HS, Kent CK, Chow JM, Boudov MR, Parvez FM, *et al*; Corrections STD Prevalence Monitoring Group. Sex and age correlates of Chlamydia prevalence in adolescents and adults entering correctional facilities, 2005: implications for screening policy. *Sex Transm Dis* 2009;36 (2 Suppl):S67-71.
- Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, Brooks JT, Pau A, Masur H; *et al.* Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep* 2009;58:1-207.
- Keane FE, Thomas BJ, Gilroy CB, Renton A, Taylor-Robinson D. The association of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalium with non-gonococcal urethritis: observations on heterosexual men and their female partners. *IJ STD AIDS* 2000;11:435-9.
- Khare A, Bansal R, Sharma S, Elhence P, Makkar N, Tyagi Y. Morphological spectrum of endometrium in patients presenting with dysfunctional uterine bleeding. *PJSR* 2012;5:13-16.
- Kihlström E, Danielsson D. Advances in biology, management and prevention of infections caused by Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *Curr Opin Infect Dis* 1994;7:25-33.
- Kodaman PH, Arici A, Seli E. Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. *Cur Opin Obstet Gynecol* 2004;16: 221-9.
- Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S. Genomic Instability and Cancer: Lessons Learned from Human Papillomaviruses. *Cancer Lett* 2011;305:113-22.
- Koskimaa HM, Paaso AE, Welters MJ, Grénman SE, Syrjänen KJ, van der Burg SH, Syrjänen SM. Human papillomavirus 16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses in children

- and their mothers who developed incident cervical intraepithelial neoplasia during a 14-year follow-up of the Finnish Family HPV cohort. *J Transl Med* 2014;12:44.
- Krawczyk E, Supryniewicz FA, Liu X, Dai Y, Hartmann DP, Hanover J, Schlegel R.** Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol* 2008;173:682-8.
- Kucinskiene V, Sutaite I, Valiukeviciene S, Milasauskiene Z, Domeika M.** Prevalence and risk factors of genital Chlamydia trachomatis infection. *Medicina (Kaunas)* 2006;42:885-94.
- Lai YM, Lee JF, Huang HY, Soong YK, Yang FP, Pao CC.** The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility. *Fertil Steril* 1997;67:1152-5.
- Lai YM, Yang FP, Pao CC.** Human papillomavirus deoxyribonucleic and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. *Fertil Steril* 1996;65:1026-30.
- Lee CA, Huang CT, King A, Chan PJ.** Differential effects of human papillomavirus DNA types on p53 tumor-suppressor gene apoptosis in sperm. *Gynecol Oncol* 2002;85:511-6.
- Leto Md, Santos-Junior GF, Porro AM, Tomimori J.** Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol* 2011;86:306-17.
- Licciardi F, Grifo JA, Rosenwaks Z, Witkin SS.** Relation between antibodies to Chlamydia trachomatis and spontaneous abortion following in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1992;9:207-10.
- Littman AJ, White E, Jackson L, Thornquist MD, Gaydos CA, Goodman GE, Vaughan TL.** Chlamydia pneumoniae infection and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1624-30.
- Liu MB, XU SR, He Y, Deng GH, Sheng HF, Huang XM, Ouyang CY, Zhou HW.** Diverse vaginal microbiomes in reproductive-age women with vulvovaginal candidiasis. *PLoS One* 2003;8:e79812.
- Longworth M, Laimins L.** Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:362-72.
- Low N.** Chlamydia (uncomplicated, genital). *Clin Evid* 2004;(12):2203-2211.
- Lukic A, Canzio C, Patella A, Giovagnoli MR, Cipriani P, Frega A, Moscarini M.** Determination of cervicovaginal microorganisms in women with abnormal cervical cytology: The role of Ureaplasma urealyticum. *Anticancer Res* 2006;26:4843-9.
- Luostarinen T, Lehtinen M, Bjørge T, Abeler V, Hakama M, Hallmans G, et al.** Joint effects of different human papillomaviruses and Chlamydia trachomatis infections on risk of squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Eur J Cancer* 2004;40:1058-65.
- Magaña-Contreras M, Contreras-Paredes A, Chavez-Blanco A, Lizano M, De La Cruz-Hernandez Y, De La Cruz-Hernandez E.** Prevalence of sexually transmitted pathogens associated with HPV infection in cervical samples in a Mexican population. *J Med Virol* 2015;87:2098-105.
- Mao C, Hughes J, Kiviat N, Kuypers J, Lee SK, Adam DE, Koutsky LA.** Clinical findings among young women with genital human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:677-84.
- Manhart LE, Holmes KK, Hughes JP, Houston LS, Totten PA.** Mycoplasma genitalium among young adults in the United States: an emerging sexually transmitted infection. *Am J Public Health* 2007;97:1118-25.
- Mårdh PA.** Influence of infection with *Chlamydia trachomatis* on pregnancy outcome, infant health and life-long sequelae in infected offspring. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16:847-64.
- Marrazzo J.** Syphilis and other sexually transmitted diseases in HIV infection. *Top HIV Med* 2007;15(1):11-6.
- Martin-Hernán F, Sanchez-Hernandez JG, Cano J, Campo J, del Romero J.** Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*

2013;18:e439-44.

Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012;9:e1001356.

Massad LS, Einstein MH, Huh WK. 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstet Gynecol* 2013;121:829-46.

McGoogan E. Liquid-based cytology: the new screening test for cervical cancer control. *J Fam Plann Reprod Health Care* 2004;30:123-5.

McLaren J, Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: Identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Hum Reprod* 1999;14:237-41.

Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman M, Kjaer SK, Palefsky J. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine* 2012;30 (Suppl 5):F24-F33.

Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, Chain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol* 1999;116:33-40.

Muñoz N, Castellsague X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006;24 (Suppl 3):S3/1-10.

Muzaffar M, Akhtar KA, Yasmin S, Mahmood-Ur-Rehman Iqbal W, Khan MA. Menstrual irregularities with excessive blood loss: A clinico-pathological correlation. *J Pak Med Assoc* 2005;55:486-9.

Nalbanski B, Borisov I, Slavkova V, Filipov E. The effect of chlamydial infection on tubal patency. *Akush Ginekol (Sofia)* 1999;38:22-4.

NCCN.org. Updated NCCN guidelines for cervical cancer screening highlight. Appropriate use of new HPV DNA test. (cited 2015). Available from: <http://www.nccn.org>

Ness RB, Goodman MT, Shen C, Brunham RC. Serologic evidence of past infection with *Chlamydia trachomatis*, in relation to ovarian cancer. *J Infect Dis* 2003;187:1147-52.

Ness RB, Kip KE, Hillier SL, Soper DE, Stamm CA, Sweet RL, Rice P, Richter HE. A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. *Am J Epidemiol* 2005 162:585-90.

Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, Meseguer MA. *Ureaplasma urealyticum* reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13: 2756-61.

Nuñez-Troconis JT. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in different gynecologic diseases. *Invest Clin* 1999;40:9-24.

Okechikwu AI. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther* 2011;11:295-306.

Ordoñez-Gallego A. Lo que aporta el siglo XX. En: Una pequeña historia de la Oncología. Madrid: Ed. Ergón. 1998. pp:71-74.

Oriel JD, Reeve P, Powis P, Miller A, Nicol CS. Chlamydial infection. Isolation of *Chlamydia* from patients with non-specific genital infection. *Br J Vener Dis* 1972;48:429-36.

Origoni M, Cristoforoni P, Carminati G, Stefani C, Costa S, Sandri MT, Mariani L, Preti M. E6/E7 mRNA testing for human papilloma virus-induced high-grade cervical intraepithelial disease (CIN2/CIN3): a promising perspective. *Ecancermedicalscience* 2015;9: 533.

Owusu-Edusei K Jr, Nguyen HT, Gift TL. Utilization and cost of diagnostic methods for sexually transmitted infection screening among insured American youth, 2008. *Sex Transm Dis* 2013;40:354-61.

Paavonen J, Eggert-Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: Impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999;5:433-47.

Paba P, Bonifacio D, Di Bonito L, Ombres D, Favalli C, Syrjänen K, Ciotti M. Co-expression of HSV2 and *Chlamydia trachomatis* in HPV-positive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions is associated with aberrations in key intracellular pathways.

Intervirol 2008;51:230-4.

Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;140:3-11.

Pérez-Andino J, Buck CB, Ribbeck K. Adsorption of human papillomavirus 16 to live human sperm. *PLoS One* 2009;4:e5847.

Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, Ruvolo G, Fiorentino FP, Alimondi P, Cefalù E, Ammatuna P. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: Impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril* 2011;95:1845-8.

Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of Human Papillomavirus Infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000318.

Rasmussen S, Eckmann L, Quayle AJ, Shen L, Zhang YX, Anderson DJ, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest* 1997;99:77-87.

Rintala MA, Grénman SE, Puranen MH, Isolauri E, Ekblad U, Kero PO, Syrjänen SM. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and Infant: a prospective study of HPV in families in Finland *J Clin Microbiol* 2005;43:376-81.

Rosas Arceo J, Toca Pprraz L, Diaz Esponda C, Nava Flores J. Chlamydia trachomatis infection in the cervix uteri. *Ginecol Obstet Mex* 1993;61:326-8.

Ross JD, Jensen JS. Mycoplasma genitalium as a sexually transmitted infection: implications for screening, testing, and treatment. *Sex Transm Infect* 2006;82:269-71.

Sabbaj S, Hel Z, Richter HE, Mestecky J, Goepfert PA. Menstrual blood as a potential source of endometrial derived CD3+ T cells. *PLoS One* 2011;6:e28894.

Safaei A, Khanlari M, Momtahn M, Monabati A, Robati M, Amooei S, Valibeigi B, Azarpira N. Prevalence of high-risk human papillomavirus types 16 and 18 in healthy

women with cytologically negative pap smear in Iran. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53:681-5.

Safaeian M, Solomon D, Castle PE. Cervical cancer prevention--cervical screening: science in evolution. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2007;34:739-60, ix.

Salamonsen LA, Lathbury LJ. Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update* 2000;6:16-27.

Salas-Treviño D, Martínez-Tamez MJ, Rodríguez-Llanas FA, Piña-Muñoz JC, Niderhauser-García A, Gallegos-Ávila MG, Alvarez-Cuevas S. Utilidad de una técnica citológica en fresco de alto contraste y alta resolución en capa fina en el diagnóstico presuntivo de la infección de VPH en mujeres con alteraciones reproductivas. *Enf Inf Microbiol* 2015;38(Supl):S43.

Samoff E, Koumans EH, Markowitz LE, Sternberg M, Sawyer MK, Swan D, Papp JR, Black CM, Unger ER. Association of Chlamydia trachomatis with persistence of high-risk types of human papillomavirus in a cohort of female adolescents. *Am J Epidemiol* 2005;162:668-75.

Sapp M, Bienkowska-Haba M. Viral entry mechanisms human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J* 2009;276:7206-16.

Schachter J. Immunodiagnosis of sexually transmitted diseases. *Yale J Biol Med* 1985; 58:443-52.

Schiffman M, Brinton L, Devesa S, Fraumeni J, Joseph F. Cervical cancer. Cancer Epidemiology and Prevention. New York: Oxford University Press. 2001.

Schiffman M, Wentzensen N. Issues in optimising and standardising the accuracy and utility of the colposcopic examination in the HPV era. *Ecancermedicalscience* 2015;9:530.

Schillaci R, Capra G, Bellavia C, Ruvolo G, Scazzone C, Venezia R, Perino A. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil Steril* 2013;100:1236-40.

Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA-México). CENEVACE. Anuarios de Morbilidad 1984-2010; CONAPO. Proyecciones de pobla-

ción en México 2005-2050.

Seraceni S, De Seta F, Colli C, Del Savio R, Pesel G, Zanin V, D'Agaro P, Contini C, Comar M. High prevalence of HPV multiple genotypes in women with persistent Chlamydia trachomatis infection. *Infect Agent Cancer* 2014;9:30.

Serman F. Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano, perspectivas en prevención y tratamiento. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2002;67:318-23.

Sharara FI, Queenan JT. Elevated serum Chlamydia trachomatis IgG antibodies. Association with decreased implantation rates in GIFT. *J Reprod Med* 1999;44:581-6.

Sharma H, Tal R, Clark NA, Segars JH. Microbiota and pelvic inflammatory disease. *Semin Reprod Med* 2014;32:43-9.

Shipitsyna E, Roos A, Dancu R, Hallén A, Fredlund H, Jensen JS, Engstrand L, Unemo M. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age - sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One* 2013;8:e60670.

Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Törnberg S, Hansson BG, et al. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer* 2005;10;116:110-5.

Simms I, Eastick K, Mallinson H, Thomas K, Gokhale R, Hay P, et al. Associations between Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, and pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Infect* 2003;79: 154-6.

Skoczyński M, Goździcka-Józefiak A, Kwaśniewska A. Prevalence of human papillomavirus in spontaneously aborted products of conception. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011;90:1402-5.

Smith EM, Johnson SR, Cripe T, Perlman S, McGuinness G, Jiang D, Cripe L, Turek LP. Perinatal transmission and maternal risks of human papillomavirus infection. *Cancer Detect Prev* 1995;19:196-205.

Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J,

Ngelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002;185:324-31.

Smith EM, Ritchie JM, Yankowitz J, Wang D, Turek LP, Haugen TH. HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2004;12:45-56.

Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 2006;208:152-64.

Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. *PLoS One* 2015;10:e0126936.

Spandorfer SD, Bongiovanni AM, Fasioulotis S, Rosenwaks Z, Ledger WJ, Witkin SS. Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertil Steril* 2006; 86:765-7.

Spear GT, St John E, Zariffard MR. Bacterial vaginosis and human immunodeficiency virus infection. *AIDS Res Ther* 2007;4:25.

Stamm WE, Norrby SR. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis* 2001;183(Suppl 1):S1-4.

Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol* 2007;107 (Suppl 1):S2-5.

Stephens RS. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol* 2003;11:44-51.

Svenstrup HF, Fedder J, Kristoffersen SE, Trolle B, Birkelund S, Christiansen G. Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, and tubal factor infertility-a prospective study. *Fertil Steril* 2008;90:513-20.

Sweet RL, Gibbs RS. Mixed anaerobic-aerobic pelvic infection and pelvic abscess. In: Infectious Diseases of the Female Genital Tract. 4th ed. Sweet RL, Gibbs RS (eds.).

- Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2002. pp:176-206.
- Taylor-Robinson D.** T-mycoplasmas and infertility. *Nature* 1974;248:267.
- Taylor-Robinson D, Stacey CM, Jensen JS, Thomas BJ, Munday PE.** Further observations, mainly serological, on a cohort of women with or without pelvic inflammatory disease. *Int J STD AIDS* 2009;20:712-8.
- Taylor-Robinson D, Thomas BJ.** The role of *Chlamydia trachomatis* genital tract and associated diseases. *J Clin Pathol* 1980;33:205-33.
- Teng K, Li M, Yu W, Li H, Shen D, Liu D.** Comparison of PCR with culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* in clinical samples from patients with urogenital infections. *J Clin Microbiol* 1994;32:2232-4.
- Terán S, Walsh C, Irwin KL.** *Chlamydia trachomatis* infection in women: bad news, good news, and next steps in prevention. *J Am Med Womens Assoc* 2001;56:100-4.
- Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM.** Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int* 2013;2013:519619.
- Tsai S, Wear DJ, Shih JW, Lo SC.** Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10197-201.
- Uribarren-Berrueta O, Sánchez-Corona J, Montoya-Fuentes H, Trujillo-Hernández B, Vásquez C.** Presence of HPV DNA in placenta and cervix of pregnant Mexican women. *Arch Gynecol Obstet* 2012;285:55-60.
- Van Der Molen RG, Schutten JH, Van Cranenbroek B, Ter Meer M, Donckers J, Scholten RR, et al.** Menstrual blood closely resembles the uterine immune micro-environment and is clearly distinct from peripheral blood. *Hum Reprod* 2014;29:303-14.
- Van Hamont D, Nissen LH, Siebers AG, Hendriks JC, Melchers WJ, Kremer JA, Massuger LF.** Abnormal cervical cytology in women eligible for IVF. *Hum Reprod* 2006; 21:2359-63.
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G.** Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 2011;10: 140.
- Verma I, Jain V, Kaur T.** Application of Bethesda system for cervical cytology in unhealthy cervix. *J Clin Diagn Res* 2014;8: OC26-30.
- Verstraelen H, Verhelst R, Vanechoutte M, Temmerman M.** The epidemiology of bacterial vaginosis in relation to sexual behaviour. *BMC Infect Dis* 2010;10:81.
- Viniker DA.** Hypothesis on the role of sub-clinical bacteria of the endometrium (*bacteria endometrialis*) in gynaecological and obstetric enigmas. *Hum Reprod Update* 1999;5:373-85.
- Volgmann T, Ohlinger R, Panzig B.** *Ureaplasma urealyticum*-harmless commensal or underestimated enemy of human reproduction? A review. *Arch Gynecol Obstet* 2005;273:133-9.
- von Knebel-Doeberitz M, Rittmüller C, Aengeneyndt F, Jansen-Dürr P, Spitkovsky D.** Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. *J Virol* 1994;68:2811-21.
- Wallace NA, Galloway DA.** Manipulation of Cellular DNA Damage Repair Machinery Facilitates Propagation of Human Papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 2014;26:30-42.
- Wallace LA, Sclar A, Hart G, Reid M, Wilson P, Goldberg DJ.** What is the excess risk in women after genital Chlamydia infection? A systematic review of the evidence. *Sex Transm Infect* 2008;84:171-5.
- Wang Y, Wang C, Qiao J, Wang L, Liang S.** Relationship of cytopathology and cervical infection to outcome of in-vitro fertilization and embryo transfer. *Int J Gynaecol Obstet* 2008;101:21-6.
- Weström LV.** Chlamydia trachomatis clinical significance and strategies of intervention. *Semin Dermatol* 1990;9:117-25.

- Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Amortegui AJ, Heine RP, Landers DV, Sweet RL.** Lower genital tract infection and endometritis: insight into subclinical pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol* 2002;100:456-63.
- Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL.** Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis* 2003;36:663-8.
- Wiesenfeld HC, Hillier SL, Meyn LA, Amortegui AJ, Sweet RL.** Subclinical pelvic inflammatory disease and infertility. *Obstet Gynecol* 2012;120:37-43.
- Witkin SS, Linhares IM.** *Chlamydia trachomatis* in subfertile women undergoing uterine instrumentation: an alternative to direct microbial testing or prophylactic antibiotic treatment. *Hum Reprod* 2002;17:1938-41.
- Woodham A, Da Silva DM, Skeate J, Raff A, Ambroso M, Brand H.** The S100A10 Subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. *PLoS One* 2012;7:e43519.
- Woods R Sr, O'Regan EM, Kennedy S, Martin C, O'Leary JJ, Timon C.** Role of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A review. *World J Clin Cases* 2014;2:172-93.
- Woolfitt JM, Watt L.** Chlamydial infection of the urogenital tract in promiscuous and non-promiscuous women. *Br J Vener Dis* 1977;53:93-5.
- World Health Organization (WHO).** In: Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Geneva: *World Health Organization* 2012:1-43.
- Xu C, Sun GF, Zhu YF, Wang YF.** The correlation of *Ureaplasma urealyticum* infection with infertility. *Andrologia* 1997;29:219-26.
- Yang Y, Jia CW, Ma YM, Zhou LY, Wang SY.** Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian J Androl* 2013;15:529-32.
- Yoon BH, Chang JW, Romero R.** Isolation of *Ureaplasma urealyticum* from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. *Obstet Gynecol* 1998;92:77-82.
- Zhang S, Tsai S, Lo SC.** Alteration of gene expression profiles during mycoplasma-induced malignant cell transformation. *BMC Cancer* 2006;6:116.
- Zhang S, Wear DJ, Lo S.** Mycoplasmal infections alter gene expression in cultured human prostatic and cervical epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;27:43-50.
- Zimmerman HL, Potterat J, Dukes R, Muth J.** Epidemiologic differences between chlamydia and gonorrhea. *Am J Public Health* 1990;80:1338-42.
- zur-Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.